ZUR AUFNAHME VON AMINOSÄUREN IN DIE LANGERHANSSCHE INSEL DER RATTE UNTERSUCHUNGEN MIT LEUCIN, GLUTAMIN, CYSTEIN, N-ACETYLCYSTEIN UND GLUTATHION

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
ANDREAS MARTIN FUSS
aus Balingen

1987

ZUR AUFNAHME VON AMINOSÄUREN IN DIE LANGERHANSSCHE INSEL DER RATTE UNTERSUCHUNGEN MIT LEUCIN, GLUTAMIN, CYSTEIN, N-ACETYLCYSTEIN UND GLUTATHION

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
ANDREAS MARTIN FUSS
aus Balingen

1987

Tag der mündlichen Prüfung: 11.Mai 1987

Dekan: Prof.Dr.D.Mecke

1. Berichterstatter: Prof.Dr.H.P.T.Ammon

2. Berichterstatter: Prof.Dr.E.Reinhard

Meiner Frau

und

meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im November 1982 unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. H.P.T. Ammon am pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Mai 1986 abgeschlossen.

Herrn Prof.Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, für seine freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon danke ich für die gute Zusammenarbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Glucoseinduzierte Insulinsekretion	1
1.1.2	Rolle der Thiole im Mechanismus der Insulinsekretion	10
1.1.3	Bedeutung von Glutathion und Cystein	13
1.1.3.1	Glutathion	13
1.1.3.2	Cystein	16
1.1.4	N-Acetyl-Cystein	18
1.1.5	Die insulinfreisetzende Wirkung von Leucin	19
1.1.6	Aufnahmemechanismen für Aminosäuren	20
1.2	Fragenstellung	23
2	MATERIAL	26
2.1	Versuchstiere	26
2.2	Geräte	26
2.3	Chemikalien	27
2.3.1	Bezogene Chemikalien und Enzyme	27
2.4	Elektrolytlösungen	28
2.4.1	Hanks Lösung	28
2.4.2	Krebs-Ringer Bicarbonatlösung	28
2.5	Inkubationsmedien	30
2.5.1	Vorinkubationsmedium	30
2.5.2	Hauptinkubationsmedium	30
2.5.3	Medium zur Bestimmung der Insulinsekretion	31

3	METHODEN	32
3.1	Isolierung der Langerhansschen Inseln	32
3.1.1	Präparation des Pankreas	32
3.1.2	Isolierung der Langerhansschen Inseln	32
3.1.3	Auswahl der Methode zur Messung von Aufnahmen an der Langerhansschen Insel	34
3.2	Versuchsablauf	37
3.2.1	Isolierung der Inseln	37
3.2.2	Vorinkubation	37
3.2.3	Hauptinkubation	37
3.2.4	Radioaktivitätsmessung	39
3.2.4.1	Probenvorbereitung	39
3.2.4.2	Zählausbeute	40
3.2.4.3	Auswertung	41
3.2.5	Verbesserung der Methode	41
3.3	Versuche zur Insulinsekretion	43
3.3.1	Versuchsablauf	43
3.3.2	Radioimmunologische Bestimmung von Insulin	44
3.3.3	Berechnung des sezernierten Insulins	45
4	EXPERIMENTELLER TEIL	47
4.1	Vorversuche	47
4.1.1	Trennungsversuche	47
4.1.2	Aufschlußversuche	48
4.2	Auswahl der Isolierungsmethode	49
4.2.1	Untersuchung der Leucinaufnahme an kalt und warm isolierten Inseln	49

4.2.1.1	Leucinaufnahme 1 yM kalt isoliert	49
4.2.1.2	Leucinaufnahme warm isoliert	51
4.2.1.3	Schlußfolgerungen	52
4.3	Bestimmung des Extrazellulärraumes	54
4.3.1	Aufnahme mit 1 yM Sucrose	56
4.3.2	Aufnahme verschiedener Sucrosekonzentrationen	57
4.3.3	Schlußfolgerungen	58
4.4	Versuche zur Insulinsekretion	58
4.4.1	Vitalitätstest	58
4.4.2	Stimulation durch Leucin	60
5	ERGEBNISSE	63
5.1	Leucinaufnahmen	
5.2	Zeitlicher Verlauf der Aufnahme	63
5.2.1	Leucin 1 yM	63
5.2.2	Leucin 10 yM	65
5.2.3	Leucin 0.1 mM	69
5.2.4	Ergebnisse	69
5.2.5	Schlußfolgerungen	70
5.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung	70
5.3.1	Leucinaufnahme mit verschiedenen Konzentrationen	70
5.3.2	Ergebnis	71
5.4	Aufnahme von Glutathion	73
5.4.1	Versuchsvorbereitung	73
5.4.2	Aufnahme von 3-H Glutathion	74
5.4.3	Aufnahme mit hoher radioaktiver Konzentration	77
5.4.4	Ergebnisse	79
5.5	Aufnahme von N-Acetylcystein	79

5.5.1	Versuchsdurchführung	79
5.5.2	Ergebnisse	80
5.6	Aufnahme von Cystein	83
5.6.1	Versuchsdurchführung	83
5.6.2	Ergebnis	84
5.6.3	Hemmung der Cysteinaufnahme durch Serin-Borat	86
5.6.3.1	Versuchsdurchführung	88
5.6.3.2	Ergebnisse	88
5.6.4	Vergleich serin-Borat / Serin	88
5.6.4.1	Versuchsdurchführung	88
5.6.4.2	Ergebnisse	89
5.7	Aufnahme von Glutamin	91
5.7.1	Aufnahmekinetik von Glutamin	91
5.7.2	Hemmung der Glutaminaufnahme durch Serin-Borat	93
5.7.2.1	Versuchsdurchführung	93
5.7.2.2	Schlußfolgerung	95
5.7.3	Einfluß von GSH und Diamid auf die Glutaminaufnahme	95
5.7.3.1	Versuchsdurchführung	95
5.7.3.2	Ergebnisse	96
5.7.3.3	Verlängerung der Inkubationszeit	96
5.7.3.4	Ergebnisse	98
5.7.3.5	Vorinkubation mit 0.1 mM Diamid	98
5.7.3.6	Ergebnisse	99
5.7.3.7	Inkubation ohne Albuminzusatz	101
5.7.3.8	Ergebnisse	101
5.7.3.9	Aufnahme geringer Glutamin-Konzentrationen	104

5.7.3.10	Versuchsdurchführung	104
5.7.3.11	Ergebnisse	104
6	DISKUSSION	106
6.1	Leucin	106
6.2	Aufnahmestudien mit Thiolen	109
6.2.1	Glutathion	109
6.2.2	N-Acetylcystein	114
6.2.3	Cystein	115
6.2.4	Lokalisation der Thiolwirkung	116
6.3	Aufnahme von Aminosäuren über den y-Glutamyl-Zyklus	120
6.3.1	Beeinflussung der Glutaminaufnahme durch GSH und Diamid	122
6.3.2	Hemmung der y-Glutamyltranspeptidase	124
6.3.2.1	Einfluß von Serin-Borat auf die Cysteinaufnahme	125
6.3.2.2	Einfluß von Serin-Borat auf die Glutaminaufnahme	127
7	ZUSAMMENFASSUNG	129
7.1	Fragenstellung	129
7.2	Versuchsergebnisse	130
7.2.1	Aufnahme von Leucin	130
7.2.2	Aufnahme con GSH und NAC	130
7.2.3	Aufnahme von Cystein	131
7.2.4	Glutaminaufnahme mit GSH und Diamid	131
7.2.5	Aminosäurentransport und Hemmung der y-GTP	131
7.3	Schlußfolgerungen	132
7.3.1	Leucin	132
7.3.2	GSH und NAC	132

7.3.3 Cystein 132

7.3.4 γ-Glutamylzyklus und Aminosäurenaufnahme 133

LITERATURVERZEICHNIS 134

A B K Ü R Z U N G E N

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	cyklisches Adenosin-3',5'-monophaosphat
cpm	counts per minute
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
dpm	disintegrations per minute
E	Einheiten
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
y-GTP	y-Glutamyl-Transpeptidase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IRI	Immunreaktives Insulin
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonat Lösung
NAC	N-Acetylcystein
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduz.
n.s.	nicht signifikant
p-CMB	para-Chlormercuribenzoat
PPS	Pentosephosphatshunt
RIA	Radioimmunoassay
RSA	Rinderserumalbumin
SEM	Standard error of the mean
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid

1 EINLEITUNG

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion

Im Jahre 1869 beschrieb Paul Langerhans die 1894 nach ihm benannten Inseln.
Aber erst Methoden zur Isolierung funktionsfähiger Inseln (Hellerström, 1964 ; Lacy und Kostianovsky, 1967) ermöglichten intensive Untersuchungen zum insulinfreisetzenden Mechanismus.

Zahlreiche Substanzen sind in der Lage, die Insulinfreisetzung aus den B-Zellen der Pankreasinsel zu beeinflussen.
Für die Glucose, den physiologisch wichtigsten Stimulator schlägt Randle et al. (1968) zwei verschiedene Hypothesen vor:

Regulator-site-model´
Hier wird ein membrangebundener Glucoserezeptor postuliert der in der Lage wäre, Glucose zu binden und dadurch die Membranpermeabilität zu verändern. In Folge käme es dann zu einem Calciumeinstrom der seinerseits wiederum Exocytose zur Folge hätte. Die Befunde, auf die sich diese Hypothese stützt sind aber teilweise sehr bruchstückhaft ja sogar widersprüchlich weshalb diesem Modell heute keine wesentliche Bedeutung mehr zugemessen wird. Trotzdem kann ein eventueller direkter Effekt der Glucose oder auch anderer Stimulatoren über einen solchen Rezeptor nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Substrate-site-model'

Diese Hypothese besagt, daß der Metabolismus von Glucose die für die Insulinsekretion benötigten intrazellulären Signale bereitstellt. Belegt wird diese Hypothese durch zahlreiche Untersuchungen. Hier sind vor allem die Untersuchungen mit metabolisierbaren und nicht metabolisierbaren Zuckern (Grodsky et al., 1963 ; Coore u. Randle, 1964) zu nennen die zeigen, daß nur metabolisierbare Zucker als Initiatoren der Insulinsekretion wirken können. Weitere Beweise liefern Untersuchungen mit Hemmstoffen der Glykolyse wie Mannoheptulose (Ashcroft et al. 1973) oder Iodacetat (Zawalich et al. 1977) die auch auf die Insulinsekretion hemmend wirken sowie Versuche mit Glykolysemetaboliten (Hellman et al. 1974, Malaisse et al. 1974) und 6-Aminonicotinamid, einem Antimetaboliten der Pyridinnukleotidsynthese (Ammon u. Steinke, 1972a)

Eine Schlüsselrolle bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion spielt das Calcium. Bereits 1966 fand Grodsky, daß die Anwesenheit extrazellulärer Calciumionen eine Voraussetzung für die Freisetzung von Insulin ist. 1968 zeigte Curry, daß die Insulinsekretion nach Glucosereiz in Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration quantitativ zunimmt.
Dagegen bewirken Hemmstofffe des Calciuminfluxes eine Abnahme der Sekretion (Henquin u. Lambert, 1974). Weiterhin fanden Malaisse und Mitarbeiter (1971), daß Glucose konzentrationsabhängig zu einer Zunahme des intrazellulären Calciumgehalts durch Aufnahme

aus dem Extrazellulärraum führt, wohingegen Mannoheptulose, ein Hemmstoff der Glykolyse, die Calciumaufnahme erniedrigt.
Wie elektrophysiologische Untersuchungen und Messungen des Rubidium-Effluxes ergaben (Henquin, 1977, 1978a , Henquin u. Meissner, 1978) führt Glucose zunächst zu einer Depolarisierung von B-Zellen, verbunden mit einer Hemmung der Kaliumpermeabilität. Wird bei dieser Depolarisierung ein bestimmter Schwellenwert überschritten, löst die verminderte Kaliumpermeabilität ihrerseits den Calciuminflux durch einen potentilabhängigen Calciumkanal aus.

Aber nicht nur durch vermehrten Einstrom von Calcium, sondern auch durch eine Hemmung des Calcium-effluxes kann es zu einer Anreicherung von intrazellulärem Calcium kommen (Malaisse, 1973).

Eine dritte Möglichkeit, die cytosolische Calciumkonzentration zu erhöhen bestünde darin, intrazellulär Calcium umzuverteilen.
Nach Hahn et al (1980) sollte unter Einfluß von cAMP vor allem eine Hemmung der Aufnahme in die Mitochondrien und weniger ein gesteigerter Efflux für eine solche Erhöhung verantwortlich sein. Neuere Untersuchungen zeigen, daß cAMP alleine nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt, sondern nur eine Kontrollfunktion für die Ionenpermeabilität an der Zellmembran der B-Zelle besitzt (Henquin, 1986).
Während Lenzen und Klöppel (1984) erhöhte Calciumkonzentrationen im Cytoplasma und in der Sekretionsgranula beobachten, messen

Prentki et al (1984) dem endoplasmatischen Retikulum die Schlüsselrolle bei der intrazellulären Calciumumverteilung zu.

Die Aufnahme von Glucose in die ß-Zelle wird durch ein spezifisches Transportsystem vermittelt (Hellman et al. 1971a). Die nach der Aufnahme sich anschließende Phosphorylierung zu Glucose-6-phosphat gilt als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Glucosemetabolismus (Ashcroft u. Randle 1970 , Hedeskov u. Capito 1974).
Anschließend an diesen Schritt sind in der Inselzelle zwei Stoffwechselwege möglich:

1. Glykolyse

Dieser Weg ist unter Einbeziehung des Krebszyklus und der Atmungskette der wichtigste energieliefernde Stoffwechselweg.
Neben der NADH-Gewinnung im Cytosol wird auch in den Mitochondrien über die Einschleusung von zuvor gebildetem Pyruvat NADH gewonnen. Über die oxidative Phosphorylierung kommt es dann zur Bildung von ATP, welches für die Insulinsekretion einerseits als Substrat von Adenylatcyclase, Natrium-Kalium-Pumpe und Calcium-ATPasen, andererseits zur Bewegung der Granula in Richtung Plasmamembran benötigt wird.
Über die vermehrte Bildung des Glucosemetaboliten Phosphoenolpyruvat (PEP) soll es zur Hemmung der ATP-abhängigen Calciumaufnahme in die Mitochondrien und damit zu einer Zunahme der cytosolischen Calciumkonzentratiuon kommen (Sudgen u. Ashcroft, 1978).

Neuere Untersuchungen messen dagegen dem endoplasmatischen Retikulum die entscheindende Rolle bei der Regulation des cytosolischen Calciums durch intrazelluläre Umverteilung zu (Prentki et al., 1984).

2. Pentosephosphatshunt (PPS)

Hauptaufgabe dieses Weges ist die Gewinnung von NADPH. Es dient bei vielen Zellreaktionen als Co-Substrat und auch für die Insulinfreisetzung wird ihm große Bedeutung zugemessen. So führt eine Steigerung der Glucosekonzentration im Medium zu einem Fluoreszenzanstieg der reduzierten Pyridinnukleotide (Panten et al. 1973).

Ammon et al. (1978a, 1980) konnten nachweisen, daß mit steigender Glucosekonzentration auch der NADPH / NADP Quotient in der Insel ansteigt, ein Effekt, der durch Leucin (10 mM) noch verstärkt werden kann (Ammon 1979a).

Ashcroft und Christie (1979) konnten nachweisen, daß der Anstieg des cytosolischen NADPH / NADP Quotienten auf eine gesteigerte extrazelluläre Glucosekonzentration zurückzuführen ist.

Substanzen, die das Redoxgleichgewicht zur oxidierten Seite hin verschieben wie z.B. Methylenblau (Ammon u. Verspohl 1979) führen auch zu einer Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion.

Auch die durch exogenes Insulin ausgelöste Senkung des NADPH / NADP Quotienten und die damit verbundene Hemmung der glucoseinduzierten Insulinfreisetzung ist vermutlich auf eine verminderte PPS-Aktivität zurückzuführen (Ammon u. Verspohl 1976). Durch

Zugabe von Insulinantikörper konnte die Ansammlung von sezerniertem Insulin im Medium verhindert und eine Zunahme der PPS-Aktivität in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium beobachtet werden (Verspohl et al. 1979). Die Feedback-Hemmung des Insulins wäre auch eine Erklärung, weshalb Ashcroft et al. (1972c) keine gesteigerte PPS-Aktivität nach Erhöhung der Glucosekonzentration finden konnten.

Zusammenfassend veranschaulicht ein Schema nach Ashcroft nochmals die beschriebenen Vorgänge.

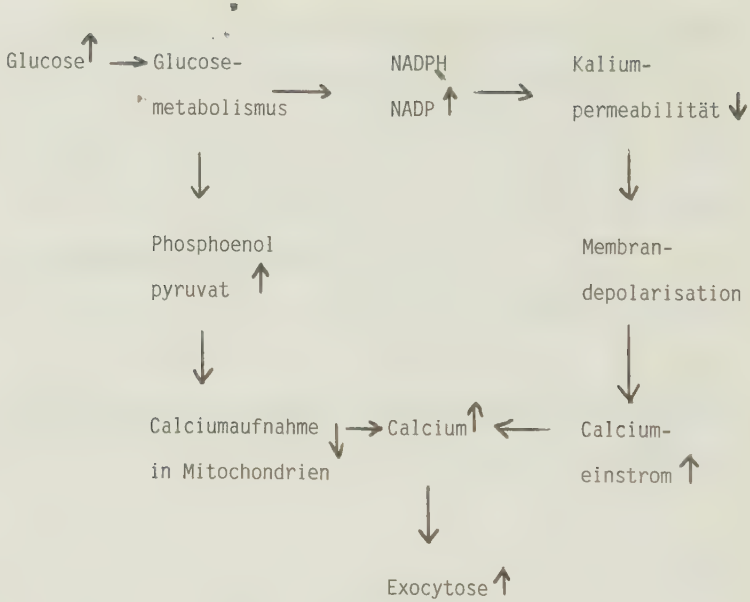


Abb. 1.1

Modell für die Regulationsmechanismen der glucoseinduzierten Insulinsekretion nach Ashcroft (1980).
Ein Anstieg der Glucose führt über zwei Wege zu einer erhöhten Calciumkonzentration im Cytoplasma:

1. Über einen Anstieg des Phosphoenolpyruvats und der nachfolgenden Hemmung der Calciumaufnahme in die Mitochondrien

2. Über die Depolarisierung der Cytoplasmamembran und dem darauffolgenden Calciumeinstrom

Dem cAMP-System wird in der Regulation der Insulinsekretion eine modulierende Rolle zugesprochen. Der verstärkte Calciuminflux nach Glucosereiz stimuliert die Adenylatcyklase die ihrerseits die Bildung von cAMP katalysiert (Charles et al., 1975 , Hellman, 1976). Dabei zeigt der cAMP-Anstieg einen ähnlichen biphasischen Verlauf wie die Insulinsekretion (Zawalich et al., 1975).

Cyklisches Adenosinmonophosphat wird als ein potenzierendes Signal der Insulinsekretion betrachtet. Hormone (z.B. Glucagon, Prostaglandine) und Arzneimittel (z.B. ß-Adrenergica) sind so in der Lage, durch Stimulation der Adenylatcyclase die Insulinsekretion zu potenzieren (Malaisse et al., 1967 , Sharp et al., 1975) und auch Methylxanthine (z.B. Theophyllin, Coffein, 3-isobutyl-1-methylxanthin) die als Inhibitoren der Phosphodiesterase zur Erhöhung des cAMP-Spiegels führen, verstärken die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Ashcroft et al., 1972a).

Der letzte Schritt bei der Insulinsekretion vom Einstrom des Calcium bis zur Exocytose wurde durch die Isolierung des Calmodulins (calcium-dependent regulatory protein) aus Langerhansschen Inseln von Ratten und Kaninchen aufgeklärt (Sugden et al., 1979 , Bartlett et al., 1980).
Trifluoperazin, eine Substanz die reversibel an das Protein bindet und damit seine Funktion hemmen kann (Weiss et al., 1980) hemmt gleichzeitig in vitro die durch Glucose und andere Stimulatoren ausgelöste Insulinsekretion (Sugden et al., 1979 ,

Schubart et al., 1980 , Krausz et al., 1980). Trifluoperazin hat dabei weder Einfluss auf den Glucosemetabolismus und den cAMP-Gehalt, noch auf den glucoseabhängigen Calciuminflux bzw. Rubidiumefflux (Henquin, 1981), was beweist, daß Calmodulin an einem späteren Punkt der Reaktionskette eingreifen muß.

Schon 1968 vermuteten Lacy et al. eine Beteiligung des kontraktilen Mikrotubulus / Mikrofilament-Systems an der Bewegung der Insulingranula, eine Vermutung, die durch Untersuchungen von Malaisse et al. (1971) mit Substanzen, die nicht nur die Stabilität der Mikrotubuli beeinträchtigten, sondern auch die glucoseinduzierte Insulinsekretion hemmten, bestätigt wurde.

Durch die Bindung von Calcium an Calmodulin kommt es vermutlich in Verbindung mit einer cAMP-abhängigen Proteinkinase zur Polymerisation des Tubulins zu Mikrotubuli. Eine weitere Folge der Calcium-Calmodulin-Bildung ist die Phosphorylierung des Myosins durch Aktivierung der calmodulin-abhängigen Myosin-Light-Chain-Kinase. Die nachfolgende ATP-abhängige Actomyosin-Kontraktion erleichtert die Bewegung der Granula entlang der möglicherweise durch Mikrotubuli vorgezeichneten Bahnen hin zur Zellmembran (Howell u. Tyhurst, 1982).

Durch Verschmelzen der Granula mit der Zellmembran kommt es dann zur Exocytose (Lacy, 1961).

1.1.2 Rolle der Thiole im Mechanismus der Insulinsekretion

Die Bedeutung des NADPH, welches zum Großteil durch den Glucosemetabolismus über den Pentosephosphatshunt entsteht, ist bereits hervorgehoben worden. Bereits 1972 vermuteten Ammon und Steinke, daß die Funktion des NADPH-Anstiegs im Sekretionsprozeß wohl darin besteht, Glutathion in reduziertem Zusand zu halten.

Nachdem von mehreren Autoren ein Anstieg des NADPH / NADP Quotienten nach Stimulation durch Glucose gefunden wurde (Ammon, 1975 , Verspohl et al., 1979 , Ashcroft u. Christie, 1979 , Malaisse et al., 1978), konnten Ammon et al. (1980) auch eine Zuhahme des GSH / GSSG Quotienten in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration zeigen.

Exogenes Insulin , das über einen Feed-back-Mechanismus die Insulinsekretion nach Glucose bzw. Glucose und Tolbutamid hemmt, senkt den GSH Gehalt der Insel (Ammon et al., 1980), was seinerseits wiederum mit einer Hemmung der PPS-Aktivität und einer Abnahme des NADPH / NADP Quotienten einhergeht (Ammon u. Verspohl, 1976).

Auch Methylenblau, das wie bereits erwähnt, zu einer Senkung des NADPH / NADP Quotienten und zur Hemmung der Insulinsekretion führt, vermindert den GSH / GSSG Quotienten (Ammon u. Verspohl, 1979 , Ammon et al., 1979b).

Auch Diamid, ein membrangängiges Thiol-Oxidans (Kosower et al., 1972) und tertiäres Butylhydroperoxid (t-BHP), welches als

Substrat der Glutathionperoxidase den GSH-Gehalt in der Inselzelle senkt (Sies et al., 1972 ; Srivastava et al., 1974) hemmen die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Ammon et al., 1977, 1979a).

Zahlreiche Substanzen, die mit Thiolgruppen auf der ß-Zellmembran reagieren können, wie z.B. Jodacetat und Jodacetamid (Hellman et al., 1973a , Pagliara et al., 1975), organische Quecksilberverbindungen (Bloom et al., 1972), Disulfide (Hellman et al., 1973b) und Ethacrynsäure (Landgraf-Leurs et al., 1978) beeinflussen auch die Insulinsekretion.
Gerade die Untersuchungen mit organischen Quecksilberverbindungen wie z.B. p-Chlormercuribenzoat (p-CMB), die nur sehr langsam durch die Plasmamembran permeieren, die Insulinsekretion aber sehr rasch stimulieren, lassen auf eine Reaktion mit extrazellulären Membranthiolen schließen (Bloom et al., 1972).
Gleichzeitig ist diese Wirkung aber auch vom intrazellulären NADPH / NADP - und GSH / GSSG - Quotienten abhängig, da die p-CMB induzierte Insulinsekretion durch Methylenblau, Diamid und tertiäres Butylhydroperoxid (Ammon et al., 1977), sowie durch exogenes Insulin (Ammon et al., 1980) hemmbar ist.

Eine klare Trennung der Oxidation von extrazellulären und intrazellulären Thiolen ermöglicht der Einsatz von Diazodicarbonsäure-N-methylpiperazid (DIP), welches rasch durch Membranen permeiert und sein nicht membrangängiges Salz (DIP-Salz) (Kosower et al., 1974, 1976).

Während DIP die durch hohe Glucosekonzentrationen (20 mM) ausgelöste Insulinsekretion ebenso wie die Calciumaufnahme hemmt, werden durch DIP-Salz bei substimulatorischer Glucose beide Parameter gesteigert, wobei dieser Effekt wiederum durch DIP hemmbar ist (Ammon et al., 1983).
Eine durch Ionophor 23187 ausgelöste Calciumaufnahme und nachfolgende Insulinsekretion kann durch DIP nicht mehr beeinflußt werden, ein Hinweis darauf, daß Schritte, die im Sekretionsmechanismus nach dem Calciumeinstrom folgen, nicht mehr durch das GSH / GSSG - System zu beeinflussen sind.

Hellman et al (1975b) konnten durch exogenen Zusatz von GSH und dextrangebundenem L-Cystein jeweil die durch Glucose induzierte Insulinsekretion potenzieren.
Am perfundierten Pankreas konnten Ammon und Abdel-Hamid (1981) durch GSH und L-Cystein die durch Glukose, Tolbutamid und Glucose + Tolbutamid stimulierte Insulinsekretion steigern.
Bei der Untersuchung verschiedener Stimulatoren der Insulinsekretion hinsichtlich ihrer Thiolabhängigkeit konnten Ammon et al. (1984) feststellen, daß nicht alle sekretionsauslösenden Stoffe an den Redoxzustand der Thiole gebunden sind.
Während die insulinfreisetzende Wirkung von Glucose, Glycerinaldehyd, Tolbutamid und Leucin sich durch GSH potenzieren und durch Diamid hemmen ließ, zeigten jene Stimulatoren, die ihre Wirkung über die Beeinflussung des cAMP-Systems vermitteln (Isoprenalin, di-Butyryl-cAMP) oder die Calcium ionophorartig ins

Zellinnere transportieren (Glibenclamid, Ionophor a-23187) keine Thiolabhängigkeit.

Zusätzlich konnten Ammon et al (1984) zeigen, daß zwei Voraussetzungen für eine Beeinflussung der Insulinsekretion durch Thiole gegeben sein müssen:

1. Es muß ein Cystein-Anteil im Molekül vorhanden sein, da weder Mesna ((Natrium-2-mercaptoethansulfonat) noch Tiorronin (2--Mercaptopropionylglycin) die glucoseinduzierte Insulinsekretion beeinflussen können.
2. Der Stimulator muß über eine freie Thiolgruppe verfügen, da weder Disulfide noch Cystein-Derivate mit blockierter Thiolgruppe, wie z.B. Carboxymethylcystein, Wirkung auf die Insulinsekretion zeigen.

1.1.3 Bedeutung von Glutathion und Cystein

1.1.3.1 Glutathion

Glutathion (y-Glutamyl-cystein-glycin; GSH) kommt in den Zellen von Pflanzen, Mikroorganismen und Säugetieren vor und ist dort in erster Linie an Metabolismus, Transport und Zellschutz beteiligt. Insbesondere die Aufrechterhaltung eines reduzierten Zellmillieus als Schutz gegenüber oxidativen Umweltbedingungen ist eine Aufgabe des GSH / GSSG - Systems (Fahey, 1977).

Der Glutathionstatus der Zelle beschreibt den Gesamtgehalt des Glutathions, wie es in all seinen Formen in der Zelle vorkommen kann. Neben dem reduzierten GSH sind es sein Dimeres (GSSG) und hauptsächlich mit Proteinen gebildete gemischte Disulfide. Normalerweise liegt GSH intrazellulär in Konzentrationen zwischen 0-5 und 10 mM vor, während GSSG nur 5 - 50 ymolar (in Ausnahmefällen bis zu 500 ymolar) vorkommt. Über den Gehalt an gemischten Disulfiden werden sehr unterschiedliche Angaben (1 - 50 % des Gesamtglutathions) gemacht (Kosower u. Kosower, 1978). Die verschiedenen Formen des Gesamtglutathions unterliegen einem dynamischen Gleichgewicht. Die an der Insel durch Änderung des GSH / GSSG - Quotienten hervorgerufene Reaktion wurde ja bereits erwähnt.

Metabolismus und Funktionen des Glutathions sind von Meister (1983) in einem Übersichtsschema zusammengefaßt worden (Abb.1.2).

Die Schutzfunktion des GSH gegenüber oxidierenden Noxen wird hauptsächlich über die Glutathion-Peroxidas (8) und verschiedenen Transhydrogenasen (10) vermittelt. Die Glutathion-Reductase (9) reduziert gebildetes GSSG in Verbindung mit NADPH wieder zu GSH. Organische Peroxide und H_2O_2 werden mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase beseitigt (Meister, 1975), ein wichtiger Schutzmechanismus für die Zelle vor Radikalen und Peroxiden.

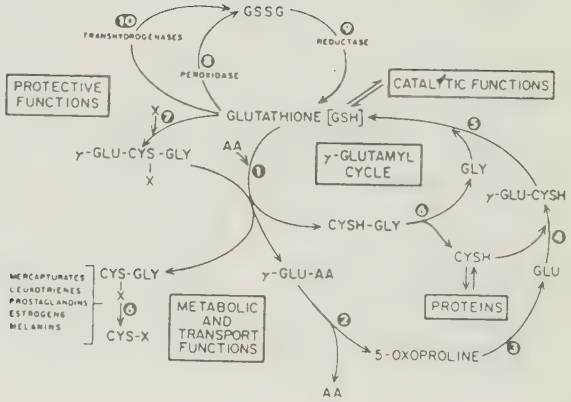


Abb 1.2 Metabolismus und Funktion von GSH

Enzyme: (1) γ-Glutamyl-Transpeptidase; (2) γ-Glutamyl-Cyclotransferase; (3) 5-Oxoprolinase; (4) γ-Glutamyl-Cystein-Synthetase; (5) Glutathion-Synthetase; (6) Dipeptidase; (7) Glutathion-S-Transferase; (8) Glutathion-Peroxidase; (9) Glutathion-Reduktase; (10) Transhydrogenasen.
AA = Aminsauren ; X = Verbindungen, die mit GSH Konjugate bilden

Die Bildung von Glutathion aus L-Glutamat, L-Cystein und Glycin wird katalysiert durch y-Glutamylcystein-Synthetase (4) und Glutathion-Synthetase (5), wobei der GSH-Spiegel durch eine Feedback-Hemmung von GSH auf die y-Glutamylcystein-Synthetase reguliert wird (Richman u. Meister, 1975).

Abgebaut wird GSH durch Abspaltung und Übertragung des y-Glutamyl-Anteils auf bevorzugte Aminosäuren mittels der y-Glutamyl-Transpeptidase (1). Nach Aufnahme der gebildeten y-Glutamyl-Aminosäuren ins Zellinnere entstehen unter Einwirkung der y-Glutamyl-Cyclotranferase (2) wieder freie Aminosäuren und 5-Oxo-L-Prolin, das weiter durch die 5-Oxo-L-Prolinase (3) in L-Glutamat gespalten wird. Parallel dazu spaltet eine Dipeptidase (6) das Cysteinylglycin, wodurch beide Aminosäuren wieder für die GSH-Synthese zur Verfügung stehen. Der hier beschriebene Weg wird heute üblicherweise als y-Glutamyl-Zyklus bezeichnet.

1.1.3.2. Cystein

Der Großteil des in der Zelle befindlichen Cysteins liegt gebunden als Bestandteil von Glutathion und gemischten Disulfiden und Proteinen vor. Der freie Anteil ist mit 10 - 300 yM sehr gering, (Tateishi et al., 1974 , Finkelstein et al., 1982), insbesondere im Vergleich mit GSH (0.1 - 10 mM, Kosower, 1976). Dafür ist aber der intrazelluläre Umsatz des Cystein sehr hoch (Cooper, 1983).

In allen untersuchten Geweben wie Nebennierenrinde, Diaphragma, Jejunum, Leber und Gehirn (Crawell u. Segal, 1976) ist der Cystein / Cystin - Quotient sehr hoch, es überwiegt also intrazellulär die reduzierte Form, während extrazellulär umgekehrte Verhältnisse herrschen.

Mit der Nahrung aufgenommenes Cystin wird rasch ins Zellinnere transportiert und dort zu Cystein reduziert. Einen durch falsche Ernährung ausgelösten Cysteinmangel kann der Organismus durch Biosynthese ausgehend von Methionin über das Cystathionin ausgleichen (Greenberg, 1975). Dieser Weg wird insbesondere von Hepatocyten genutzt, wie der Einbau von Methionin-Schwefel in Cystein beweist (Beatty u. Reed, 1980), während Zellen anderer Organe nur eine begrenzte oder auch keine Möglichkeit haben, Cystein zu synthetisieren (Reed et al., 1983).

L-Cystein in freier Form wird für die Glutathionsynthese benötigt. In einer Untersuchung an Erythrocyten wurde beobachtet, daß die Aufnahme von Cystein in die Zelle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Glutathionbiosynthese ist (Heinle et al., 1976). Tateishi et al. (1977) konnten zusätzlich eine Proportionalität zwischen GSH-Resynthese und Cysteingehalt in der Nahrung nachweisen. Daraus kann gefolgert werden, daß der Gehalt an L-Cystein in der Zelle der limitierende Faktor für die Glutathionbiosynthese ist.

1.1.4 N - Acetyl - L- Cystein

Die Substanz N-Acetyl-L-Cystein ist vor allem durch seinen Einsatz als mukolytisches Expectorans bekannt geworden. Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit Resorption, Verteilung und Ausscheidung nach oraler und intramuskulärer Gabe beschäftigt. Die Substanz verteilt sich rasch und erreicht im Plasma, in der Leber, den Nieren und in der Lunge maximale Konzentrationen (Sheffner, 1963 , Sheffner et al., 1966 , Lorber et al., 1970 , Gazzaniga et al., 1976).

Die Beobachtungen von Bonamomi und Gazzaniga (1980), daß nach intravenöser Gabe von radioaktiv markiertem N-Acetyl-Cystein nach einer Verteilungsphase von ca 30 Minuten der Blutspiegel an radioaktivem Schwefel über Stunden konstant blieb sind nicht allzu aussagekräftig, da der markierte Schwefel alleine nichts über die eigentliche Verbindung aussagen kann.

Brackertz (1984) konnte an Ratten nach ebenfalls intravenöser Gabe von N-Acetyl-Cystein eine Erhöhung der Gesamt-Thiole und der löslichen Thiole im Plasma messen. Eine Erhöhung der proteingebundenen Thiole war allerdings erst bei höherer Dosis (0.3 mmol/kg) feststellbar.

Die von Brackertz (1984) und Hehl (1984) durchgeführten Versuche zur Insulinsekretion in vivo und in vitro führten zu folgendem Ergebnis:

Die Gabe von N-Acetylcystein allein führt zu keiner Zunahme der Insulinsekretion in vivo und erhöht auch nicht die Insulinausschüttung an der isolierten Insel bei substimulatorischer Glucose.

Die Verabreichung von N-Acetylcystein in Kombination mit Glucose führt in vivo bei der Ratte zu einer starken Erhöhung der Insulinsekretiuon. In vitro führt N-Acetyl-Cystein in einem Konzentrationsbereich von 0.05 - 0.5 mM zu einer signifikanten Steigerung der glucose-induzierten Insulinsekretion.

1.1.5 Die insulinfreisetzende Wirkung von Leucin

Die Insulinfreisetzende Wirkung von Leucin unterscheidet sich von der anderer Aminosäuren (Fajans et al., 1967). Leucin ist die Aminosäure, die auch in Abwesenheit von Glucose in der Lage ist, die Insulinsekretion zu stimulieren und Substanzen, die die glucose-induzierte Insulinsekretion steigern, zeigen diesen Effekt auch auf die leucin-stimulierte Insulinfreisetzung (Milner, 1969).

Parallele Gabe von Glucose und Leucin erhöhen den NAHH / NAD - sowie den NADPH / NADP - Quotienten (Ammon et al., 1979).
Zusammen mit Glucose führt Leucin (10 mM) zu einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären GSH-Levels (Ammon, 1981).

Durch Zusatz von GSH kann die leucin-stimulierte Insulinsekretion gesteigert werden (Ammon, 1984)

1.1.6 Aufnahmemechanismen für Aminosäuren

Die Aufnahme von Aminosäuren durch die Cytoplasmamembran ins Zellinnere ist notwendige Voraussetzung für zahlreiche Stoffwechselvorgänge. Es ist daher anzunehmen, daß jede Zelle Mechanismen zur Einschleußung von Aminosäuren besitzt.

In Untersuchungen mit 14-C markierten Aminosäuren (Cooperstein et a. 1975) wurden die in verschiedenen Geweben gemessenen Aktivitäten mit der im Blut vorhandenen Aktivität verglichen. Es stellte sich heraus, daß alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Prolin, sich in allen Geweben anreicherten. Unterschiedlich von Gewebe zu Gewebe war der Grad der Anreicherung der ebenfalls von der jeweils eingesetzten Aminosäure abhängig war.

Die ebenfalls untersuchten Pankreasinseln zeigten ein im Vergleich zu anderen Geweben recht hohes Aufnahmevermögen (Cooperstein et al., 1975 , Le Cam u. Freychet, 1977)

Eine Erhöhung der Gewebespiegel gegenüber den im Blut vorhandenen Konzentrationen bedingt eine Aufnahme gegen einen Konzentrationsgradienten, wofür ein aktiver Transportmechanismus Voraussetzung ist.

Nach Aufnahmestudien an Ehrlich Ascites Tumorzellen mit neutralen Aminosäuren unterschieden Christiansen et al. (1973) zwischen zwei natriumabhängigen (A und ASC) Systemen und einem natriumunabhängigen (L) System.

Bei den natriumabhängigen werden die Aminosäuren zusammen mit Natrium unter Ausnutzung dessen Konzentrationsgradienten aufge-

nommen, während beim natriumunabhängigen der Konzentrationsgradient einer zuvor im Zellinneren angereicherten Aminosäure ausgenutzt wird.
Auch an isolierten Hepatocyten (Le Cam et al., 1977) wurden diese Mechanismen gefunden.

Folgende Mechanismen gelten nach einer Aufstellung von Jungerman und Möhler (1980) heute als gesichert:

a) Natrium-Aminosäuren-Symport
Die für diesen aktiven Substrat-Transport notwendige Energie wird dem elektrochemischen Natriumgradienten entnommen. Dieser Gradient wird durch die ständig arbeitende Natriumpumpe in der Zellmembran aufgebaut und aufrechterhalten. Der dem Natriumtransport entgegengerichtete Aminosäuren-Transport erfolgt dann im Co-Transport von Substratmolekül und Natrium entlang dem elektrochemischen Natriumgradienten. Aufgenommen werden über diesen Mechanismus bevorzugt Cystein, Serin, und Glutamin.

b) Aminosäuren-Antiport
Auch hier ist die eigentlich treibende Kraft die Na-K-ATPase. Für die Aufnahme selbst wird der Konzentrationsgradient einer im Zellinnern zuvor angereicherten Aminosäure dazu benutzt, um im Austausch eine andere extrazelluläre Aminosäure aufzunehmen.
Über diesen Mechanismus werden bevorzugt Leucin und Valin aufgenommen.

Neben diesen beiden Systemen wird noch ein Imino-Glycin-System beschrieben, das für die Glycin-Aufnahme verantwortlich ist, und ein überlappendes System, das im Zusammenhang mit Methionin und Histidin steht.

Daneben wird noch ein weiterer Aufnahmemechanismus für Aminosäuren diskutiert.
An der Niere konnte Meister (1983) die Aufnahme von Aminosäuren über den y-Glutamyl-Zyklus zeigen. Intrazelluläres Glutathion wird nach Efflux aus der Zelle durch membranständige y-Glutamyl-Transpeptidase aufgespaltet in Cysteinylglycin und einen y-Glutamylrest, der seinerseits auf einen Akzeptor übertragen wird. Als Akzeptoren kommen unter anderem auch Aminosäuren wie Cystin oder Glutamin in Frage, die, gebunden an den y-Glutamylrest, in die Zelle wandern.
Auch Valin und Histidin werden möglicherweise über diesen Weg aufgenommen (Vina et al., 1980).

1.2 Fragenstellung

Da die im Arbeitskreis zu Aufnahmemessungen eingeführte und weiterentwickelte Methode sich nach gründlicher Analyse als ungeeignet herausstellte, sollte zunächst eine geeignete Technik aus den in der Literatur bekannten Methoden ausgewählt und erarbeitet werden.

Die methodischen Arbeiten umfaßten folgende Teilschritte:

1. Auswahl der sogenannten Zentrifugationsmethode.
   Diese Technik wird von zahlreichen Autoren zu Aufnahmeversuchen eingesetzt.

2. Aufbau der Methode und Austestung mit der Leucin an Inseln, die unter verschiedenen Bedingungen gewonnen wurden.

3. Da aus technischen Gründen doppelt markierte Proben nicht ausreichend exakt gemessen werden konnten, mußte für die in der Literatur übliche Bestimmung des Extrazellulärraums durch Doppelmarkierung ein Ersatz gefunden werden.
   Darüberhinaus wurde die Empfindlichkeit der Methode verbessert.

4. Abschließend wurde gezeigt, daß die Inseln unter den gewählten Versuchsbedingungen in der Lage sind, auf einen Glucosereiz hin Insulin auszuschütten (Vitalitätstest).

Mit Hilfe dieser Methode sollten nun verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden.

1) Zunächst sollte die Aufnahme von Leucin in die Langerhanssche Insel in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration im Inkubationsmedium gemessen werden.
Hier sollte untersucht werden, ob die Aufnahme möglicherweise schon in einem Konzentrationsbereich gesättigt ist, in dem noch keine Stimulation der Insulinsekretion zu beobachten ist.

2) Die potenzierende Wirkung der Thiole auf die Insulinsekretion konnte bisher noch nicht sicher lokalisiert werden.
Es sollte daher untersucht werden, ob Glutathion, N-Acetyl-Cystein und Cystein in den Konzentrationen, in denen sie die Insulinsekretion beeinflussen, in die Langerhanssche Insel aufgenommen werden, oder ob ihr Angriffspunkt extrazellulär zu suchen ist.

3) Der y-Glutamyl-Zyklus stellt an verschiedenen Geweben ein Aufnahmesystem für Aminosäuren wie z.B. Cystin oder Glutamin dar. Im letzten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Beweise für ein Funktionieren dieses Zyklus an der Insel zu finden sind und ob er als Aufnahmemechanismus hier quantitativ eine Rolle spielt.
Zu diesem Zweck sollte versucht werden, durch Hemmung des Schlüsselenzyms, der y-Glutamyl-Transpeptidase, die Aufnahme von Glutamin in die Langerhanssche Insel zu hemmen.

4) Zum Abschluß sollte untersucht werden, ob der Aminosäurentransport an der Insel in irgendeiner Weise thiolabhängig ist. Zu diesem Zweck sollte die Glutaminaufnahme zum einen mit exogenen Zusatz von GSH, zum andern nach Oxidation des intrazellulären Glutathions mittels Diamid, gemessen werden.

2. M A T E R I A L

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere waren drei bis fünf Monate alt und wogen zwischen 200 und 300 g.

Die Haltung erfolgte in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur von 24 - 26 °C und bei einer relativen Luftfeuchte von 55 - 65% im 12 Stunden Tag / Nacht - Rythmus. Gefüttert wurden die Ratten mit Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe, Trinkwasser erhielten sie ad libitum.

2.2 Geräte

Stereomikroskop Nikon SM 6

Schüttelwasserbad, Firma Köttermann

Digital pH-Meter Beckmann, Modell 3560

Magnetrührer, IKA-Combimag RCT, Firma Janke u. Kunkel KG

Ultraschallbad Econoclean

Flüssig-Szintillationszähler, Nuclear Chicago

Szintillations-Zählfläschchen, Firma Zinsser, Frankfurt a.M.

Whirlmix, Vortex-Genie, Firma Wilten u.Co.

Microfuge B, Firma Beckmann

Mikrogefäße Beckmann

IBM PC

2.3 Chemikalien

2.3.1 Bezogene Chemikalien und Enzyme

Collagenase	Worthington Biochem.Corp.
D-Glucose p.A. wasserfrei	Serva Heidelberg
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Silikonöl Versilube F 50	Klöckner, Duisburg
HEPES	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Insulin-Radioimmunoassay	
Kit-INSIK	Isotopendienst West, Sprendlingen
^{3}H Sucrose sowie	
^{14}C Leucin	Amersham Buchler, Braunschweig
^{3}H Glutathion	New England Nuclear, Boston, USA
^{14}C Cystein	Amersham Buchler
^{14}C N-Acetyl-Cystein und	
^{14}C Glutamin	Amersham Buchler, Braunschweig

Alle anderen, nicht angeführten Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form (p.A.) bezogen.

2.4 Elektrolytlösungen

2.4.1 Hanks Lösung (Hanks und Wallace, 1949)

Stammlösung

NaCl	80,00 g
KCl	4,00 g
$Na_2HPO_4 * 2 H_2O$	0,60 g
KH_2PO_4	0,60 g
$MgSO_4 * 7 H_2O$	2,00 g
$CaCl_2 * 2 H_2O$	1,85 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnt, 0,5 mg/ml Glucose zugesetzt (=2,8 mM) und mit $NaHCO_3$-Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.2. Krebs Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Die verwendete KRB - Lösung setzt sich nach der Originalbeschreibung von Umbreit und Mitarbeitern, 1972 folgendermaßen zusammen:

NaCl-Lösung	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Um jeweils eine frische Lösung zur Verfügung zu haben, erwies es sich als praktisch, drei voneinander getrennte Stammlösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

Lösung A

NaCl	69,20 g
KCl	3,61 g
KH_2PO_4	1,62 g
$MgSO_4 * 7 H_2O$	2,93 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml

Lösung B

$NaHCO_3$	21,10 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml

Lösung C

$CaCl_2 * 2 H_2O$	3,73 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml

Vor den Versuchen wurde folgende Mischung jeweils frisch hergestellt:

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua bidest	7 Teile

2.5 Inkubationsmedien

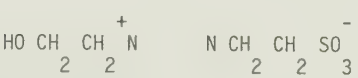
im Einzelnen wurden folgende Lösungen verwendet :

2.5.1 Vorinkubationsmedium

Für die Vorinkubation wurde KRB-Lösung mit Zusatz von 2 % Rinderserumalbumin und 3 mM Glucose verwendet

2.5.2 Hauptinkubationsmedium

Auch für die Hauptinkubation wurde KRB - Lösung unter Zusatz von 2% Rinderserumalbumin verwendet.
Da in den Beckmann-Zentrifugenröhrchen inkubiert wurde und eine Carbogenbegasung hier technisch kaum möglich ist wurde für die Hauptinkubation das $NaHCO_3$ durch 10 mM Hepes ersetzt.
Diese Puffersubstanz benötigt keine Begasung.



HEPES = N-2-hydroxy-piperazin-N-2-ethansulfonsäure

Hepes ist ein Zwitterion mit einem pK_a von 7.31 bei $37^{o}C$. Der Temperatureinfluß auf den pH-Wert beträgt: $pK_a / {}^{o}C = - 0.0014$ (Henquin 1976).
Um diesen Effekt auszugleichen wurde der pH-Wert bei $37^{o}C$ mit 0.1 normaler Natronlauge eingestellt .

Bei Verwendung gelöster radioaktiver Substanzen mit geringer Löslichkeit mußte der Verdünnungseffekt auf die Endkonzentration der Elektrolyte mitberücksichtigt werden.

Stark oxidationsempfindliche Thiole wurden erst unmittelbar vor Beginn der Hauptinkubation dem Medium zugegeben.

2.5.3 Medium zur Insulinsekretionsbestimmung

Das zur Messung der Insulinsekretion verwendete Medium entsprach dem Hauptinkubationsmedium.
Zusätzlich wurden noch 3 mM beziehungsweise 16,7 mM (Endkonzentration) Glucose zugesetzt.

3 METHODEN

3.1 Isolierung der Langerhansschen Inseln bei erwachsenen Ratten nach Lacy und Kostianovsky, 1967

3.1.1 Präparation des Pankreas

Den mit Äther narkotisierten Ratten wurde durch einen Längsschnitt vom Brustbein bis zur Beckenregion sowie durch Querschnitte in Becken- und Rippenhöhe das Abdomen geöffnet. Mit einer Pinzette wurde das Duodenum unter dem Leberlappen hervorgezogen. Der so sichtbar gewordene Ductus pancreaticus konnte jetzt mit einem Faden zur Leber hin abgebunden werden.Das Duodenum wurde in Richtung Magen abgeklemmmt. In den Ductus hepaticus wurden nun mit einer feinen Kanüle 10 ml Nährlösung injiziert. Der somit aufgeblähte und gut sichtbare Pankreas wurde darauf mit einer Schere von Milz, Magen, Darm und Leber getrennt, in einer Petrischale zweimal gewaschen und von anhängendem Fettgewebe befreit.

3.1.2 Isolierung der Langerhansschen Inseln

Der Pankreas wurde mit einer Schere gleichmäßig so fein zerschnitten, daß die Teilchen sich ohne großen Widerstand durch den Konus einer 5 ml Rekordspritze aufsaugen ließen. Nach

Überführung in einen zuvor tarierten 25 ml Meßzylinder wurde mehrmals mit Nährlösung aufgefüllt und nach Absitzen des Gewebes der Überstand mit eventuell verbliebenen Fettresten abgesaugt Dieser Waschvorgang wurde solange wiederholt, bis der Überstand klar war. Jetzt wurde das Feuchtgewicht des zerkleinerten Pankreas bestimmt und pro Gramm Gewebe 650 U Collagenase dazugegeben. Zur Verdauung des exokrinen Gewebes wurde der 25 ml Meßzylinder in ein auf 37 °C Celsius thermostatisiertes Wasserbad gestellt und mit einem Magnetrührer zunächst zwei Minuten bei 1100 Umdrehungen, dann zwölf Minuten bei 100 Umdrehungen gerührt.

Um den Verdauungsvorgang abzustoppen wurde das Gewebe drei mal abzentrifugiert und die Kollagenesa durch Dekantieren des Überstands entfernt. Zur weiteren Homogenisierung wurde dann das Gewebe je nach Zerkleinerungsgrad 4 bis 8 mal vorsichtig durch den Konus einer Rekord-Spritze angesaugt und wieder herausgepresst.

Da die Inseln ein höheres spezifisches Gewicht als das exokrine Gewebe besitzen konnten sie anschließend durch Aufschwemmen mit Medium und Absitzenlassen teilweise von dem begleitenden exokrinen Gewebe befreit werden.

Unter einem Stereomikroskop wurden die Inseln dann mit Hilfe einer Pedersen - Pipette aussortiert. Ein Okularmikrometer half bei der Wahl einer möglichst einheitlichen Inselgröße.

3.1.3 Auswahl einer Methode zur Messung von Aufnahmen an der Langerhansschen Insel

Ziel der Arbeit war es zunächst eine geeignete Methode für Aufnahmemessungen an der Langerhansschen Insel auszuwählen. Hierzu stand eine im Arbeitskreis zur Messung der Calciumaufnahme entwickelte Methode zur Verfügung (Hägele 1981).
Bei dieser Technik werden sogenannte Netzgefäße d.h. Polystyrol-Röhrchen mit einem eingeklebten feinmaschigen Netz verwendet. Zur Inkubation werden die Inseln auf das Netz pipettiert das einerseits fein genug ist, die Inseln zurückzuhalten, andrerseits den Ein- und Ausstrom des Mediums nicht behindert.
Die Röhrchen werden dann in ein Medium eingetaucht, das die zu messende Substanz in radioaktiv markierter Form enthält. Nach Beendigung der Inkubation werden die Inseln gewaschen, die Netze von den Röhrchen abgetrennt, zusammen mit den anhaftenden Inseln in ein Szintillationsfläschchen gegeben und die Radioaktivität gemessen.

Der Hauptvorteil dieser Methode liegt darin, daß jederzeit problemlos und schnell das Inkubationsmedium gewechselt werden kann bzw. die Inseln ausgewaschen werden können. Aber es sind auch einige Nachteile damit verbunden:

- am Netz anhaftende Restaktivität sorgt für einen relativ hohen Background bei der Messung der Radioaktivität.

- ein nur sehr schwer zu berechnender Efflux während des Auswaschens am Ende der Inkubation verfälscht die tatsächlichen Aufnahmewerte.

- systembedingt wird sehr viel radioaktive Substanz verbraucht.

Neben dieser Methode wird in der Literatur eine weitere Technik zur Aufnahmemessung an der Langerhansschen Insel beschrieben. (Lernmark et al. 1975, Henquin et al. 1975, Malaisse et al. 1978) Verwendet werden hier Beckmann Zentrifugenröhrchen (Fassungsvermögen 450 ul) Während der Inkubation hat man in den Röhrchen drei Phasen. Oben das wässrige Inkubationsmedium mit den Inseln und der markierten Substanz, in der Mitte ein Siliconöl und unten Kalilauge oder Harnstofflösung. Das Siliconöl liegt in der Dichte genau zwischen dem Medium und der Lösung unten.

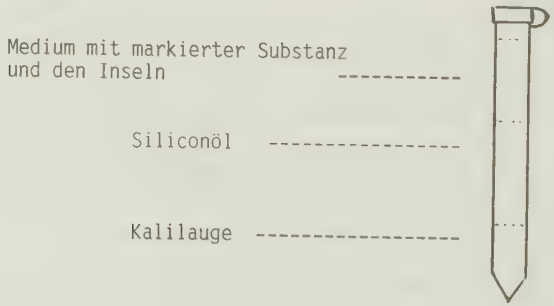


Abb. 2.1 Inkubationsröhrchen

Will man nun die Inkubation beenden, wird das Röhrchen einfach bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert. Die (schwereren) Inseln gehen durch das Siliconöl während das radioaktive Medium oben bleibt. Durch Kalilauge bzw. Harnstofflösung werden die Inseln denaturiert und die aufgenommene Aktivität kann sofort bestimmt werden. Gegenüber der zuvor beschriebenen Netzmethode finden sich hier einige Vorteile:

- geringer Verbrauch an Radioaktivität durch kleine Volumina
- das für ein wässriges Medium undurchlässige Siliconöl garantiert eine schnelle und vollständige Trennung der Inseln von dem radioaktiven Medium und dadurch einen gleichmäßig niederen Background.
- eine unerwünschte Kontamination, die auch die Meßergebnisse verfälschen kann, ist praktisch ausgeschlossen.

Da auch Substanzen , die nicht oder nur in geringem Umfang von der Zelle aufgenommen werden, zur Untersuchung standen, fiel die Wahl auf die empfindlichere zweite Methode.
Neben den oben genannten Vorteilen erlaubt sie obendrein ein sehr zügiges und sauberes Arbeiten weshalb diese Methode in der Literatur heute für Aufnahmestudien Standard ist (Lernmark, 1975 , Henquin, 1976 , Malaisse, 1978).

3.2 Versuchsablauf

Für die ersten Aufnahmeversuche wurde folgender Versuchablauf gewählt:

3.2.1. Isolierung der Inseln

Die Inseln wurden wie oben beschrieben isoliert und ausgelesen. Dabei wurde bis zur Kollagenase-Verdauuung unter ständiger Eiskühlung bei einer Temperatur von ca 2 bis 3 Grad gearbeitet. Als Medium diente eisgekühlte Hankš-Lösung.

3.2.2 Vorinkubation

Um den Stoffwechsel nach dem Isolierungsprozeß zu regenerieren, wurde eine Vorinkubation der Inseln durchgeführt. Dazu wurden die Inseln in ein 5 ml Gläschen einsortiert und im Vorinkubationsmedium eine halbe Stunde im Wasserbad bei 37 °C mit etwa 60 Bewegungen in der Minute geschüttelt.

3.2.3 Hauptinkubation

Nach Beendigung der Vorinkubation wurden die Inseln ins Hauptinkubationsmedium umgelesen. Bei diesem Schritt erfolgte dann auch eine Auslese nach Inselgröße mit Hilfe eines Okularmikrometers. Mit einer Pedersen-Pipette wurden je 10 Inseln in genau

100 uL Medium vorsichtig in die Zentrifugenröhrchen auf die Ölschicht pipettiert.

Der Start der Hauptinkubation erfolgte durch Zugabe der markierten Substanz (gelöst im Medium) zu den zuvor im Wasserbad auf 32 °C erwärmten Inseln. Beim Einpipettieren konnte beobachtet werden wie die Inseln aufgewirbelt wurden, was einerseits eine gleichmäßige Vermischung garantierte und andererseits sicherstellte, daß die Inseln nicht möglicherweise in die Ölschicht eingesunken waren.

Gestoppt wurde die Inkubation durch eine 20 Sekunden dauernde Zentrifugation bei ca 10 000 U/Min.
Zur Abtrennung der Röhrchenspitzen wurde eine zu diesem Zweck angefertigte Schneidemaschine verwendet. (Abb. 2.2)
Die höhenverstellbare Halterung wurde so fixiert, daß exakt die Spitze mit den durch die Kalilauge denaturierten Inseln abgeschnitten wurde.

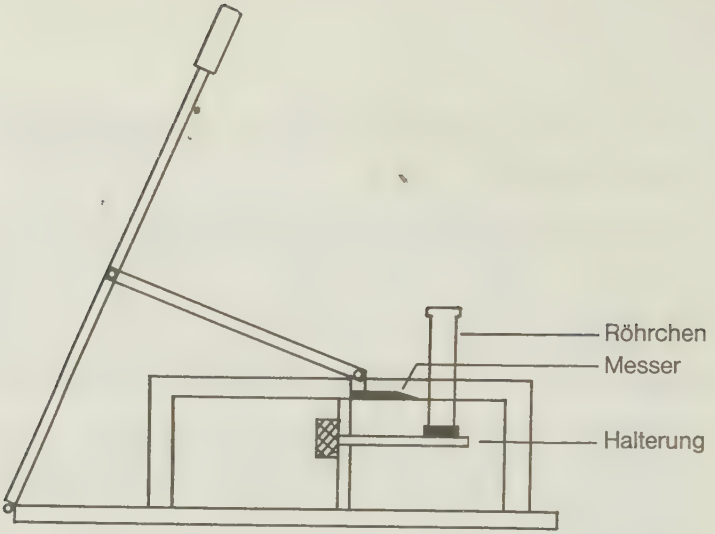


Abb. 2.2 Schneidegerät für Beckmann Zentrifugenröhrchen

3.2.4. Radioaktivitätsmessung

3.2.4.1 Probenvorbereitung

Die abgetrennten Spitzen wurden direkt in ein Szintillationsfläschchen gegeben und zusammen mit 4 ml Bray-Szintillator geschüttelt. Parallel dazu wurde vom Überstand ein Aliquot entnommen und in derselben Weise in Bray-Szintillator überführt.
Um Lumineszenzen abklingen zu lassen wurden die Proben im Anschluß daran über Nacht im Dunkeln stehen gelassen und am nächsten Tag in einem Szintillationszähler gemessen.

Gemessen wurde in zwei verschiedenen Kanälen jeweils mit und ohne externen Standard.

Die Kanäle umfaßten folgenden Energiebereich:

Tritium: 0.5 - 20 KEV

C - 14: 0.6 - 50 KEV

3.2.4.2. Zählausbeute

Die Zählausbeute ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben festen Parametern wie Zählgerät, Meßkanal oder Szintillationscocktail spielt vor allem der Quench eine Rolle. Zahlreiche Substanzen, darunter auch Kalilauge, führen zu einer Verringerung der Strahlungsenergie und infolgedessen zu einer verminderten Zählausbeute.

Bei der Verwendung von C-14 markierten Substanzen konnte dieser Quench durch die Wahl eines nach unten sehr weit offenen Fensters vernachlässigt werden. Die unter denselben Bedingungen früher gemessene Ausbeute von 81 % konnte übernommen werden.

Die Ausbeute für Tritium wurde experimentell ermittelt. Hierzu wurde 50 uCi radioaktive tritiummarkierte Sucrose zum einen ohne, zum andern mit 50 ul dreimolarer Kalilauge und 10 Inseln in 4 ml Bray-Szintillator pipettiert.

Im Mittel aus 7 Messungen ergaben sich folgende Werte:

1) ohne KOH 43178 cpm = 39.3 %

2) mit KOH 27989 cpm = 25.5 % Zählausbeute

3.2.4.3. Auswertung

Die Aufnahmen wurden zunächst als relative und absolute, später nur noch als absolute Aufnahmen berechnet.
Für die relativen Aufnahmen wurden die bei Messung der Inseln ermittelten Countzahlen zu den ebenfalls ermittelten Gesamtcounts nach folgender Formel ins Verhältnis gesetzt :

$$\frac{x}{a * (y + x)} * 100 = Z\ (\%)$$

x: cpm im Sediment

y: cpm im Überstand

a: Faktor zur Umrechnung Aliquot / Gesamt-cpm

Z: prozentuale Aufnahme

Die absoluten Aufnahmen wurden mittels eines selbst entwickelten Basic-Programms (siehe Anhang) berechnet. Die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten aus verschiedenen Lieferungen wurden dabei ebenso berücksichtigt wie die jeweiligen Verdünnungen mit nicht markierter Substanz.

3.2.5 Verbesserung der Methode

Im Laufe der Vorversuche zeigte sich, daß die Methode möglicherweise nicht empfindlich genug ist, denn die bei den ersten Versuchen gemessenen Leerwerte lagen stets etwas höher als der reine Background. Dies ist ein Zeichen dafür, daß Spuren von Radioaktivität auch ohne Anwesenheit von Inseln durch das

Siliconöl in die Kalilauge gelangen können.
Je höher nun die Radioaktivität im Überstand ist, desto höher fällt auch der Leerwert aus. Verläuft wie in diesem Fall die Aufnahme nicht linear, so wird die für die Berechnung herangezogene Countzahl (Gesamtcounts - Leerwert) mit steigender Konzentration immer kleiner und das System kommt an seine Grenze. Da eine Erhöhung der radioaktiven Konzentration auch eine Anhebung der Leerwerte mit sich bringt bleibt als einziger Ausweg eine Absenkung der Leerwerte.

Ausgehend von der Überlegung, daß die verschleppte Radioaktivität einen Träger benötigt wurde das Inkubationsmedium nach möglichen Verunreinigungen untersucht. Es stellte sich heraus, daß trotz der Verwendung von destilliertem Wasser zahlreiche Partikel in der Lösung schwammen. Als Quelle dieser Verunreinigungen wurde das Rinderserumalbumin vermutet.

Um Verunreinigungen zu vermeiden wurden ab jetzt sämtliche Inkubationslösungen mittels eines engporigen Filters partikelfrei filtriert.
Die gewünsche Absenkung der Leerwerte wurde dadurch erreicht und die radioaktive Konzentration konnte um zwei Zehnerpotenzen angehoben werden.

3.3 Versuche zur Insulinsekretion

Durch Messung der Insulinsekretion sollte gezeigt werden, daß die Inseln so wie sie für die Aufnahmeversuche eingesetzt werden auch am Leben und in der Lage sind auf einen Reiz hin Insulin freizusetzen.

3.3.1 Versuchsablauf

Die Inseln wurden genau wie für die Aufnahmeversuche isoliert und vorinkubiert. Jeweils 5 Inseln wurden im Anschluß daran in ein Polystyrolröhrchen einpipettiert, überstehendes Medium abgesaugt und je 0.7 ml Inkubationsmedium zugegeben.
Die Inkubation erfolgte 90 Minuten lang bei 37 °C im Schüttelwasserbad.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Röhrchen zur sicheren Durchmischung auf dem Whirlmix geschüttelt und kurz stehen gelassen bis die Inseln sedimentiert waren.
Aus dem Überstand wurden darauf je 0.1 ml entnommen und im Gefrierschrank bei einer Temperatur unter 25 °C bis zur Insulinbestimmung aufbewahrt.
Um eventuelle Abweichungen bei der Berechnung korrigieren zu können wurden die Inseln unter dem Mikroskop nachgezählt und eventuelle Abweichungen im Versuchsprotokoll vermerkt.

3.3.2 Radioimmunologische Bestimmung von Insulin

Die Insulinkonzentration im Inkubationsmedium wurde durch Radioimmunoassay in Doppelbestimmungen nach der Doppelantikörpermethode (Soeldner und Slone, 1965) mit dem INSIK-Kit bestimmt.

Durchführung der Bestimmung

Die Insulinkonzentration in der dem Inkubationsmedium entnommenen Menge war für diese Bestimmung zu hoch. Aus diesem Grund mußten die Proben zunächst mit je 0.9 ml der folgenden Pufferlösung verdünnt werden:

$NaH_2PO_4 * H_2O$		550 mg
Rinderserumalbumin		100 mg
Aqua bidest	ad	100 ml

Diese Lösung wurde mit 1 normaler Natronlauge auf pH 7.4 eingestellt.

Von den Proben, die damit ein Volumen von 1 ml hatten, wurde wiederum jeweils 0.1 ml für die Bestimmung entnommen und in zuvor durchnummerierte Polystyrolröhrchen einpipettiert.

In derselben Weise wurden die Proben für eine Eichkurve im Bereich zwischen 0 und 2000 uE IRI/ml vorbereitet. Als Nullpunkt wurden 0.1 ml Puffer vorgelegt, für die Insulinwerte wurde Ratteninsulin einpipettiert.

Der lyophilisierte Antikörper wurde der Vorschrift entsprechend gelöst und je o.1 ml davon zu den Proben gegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurden die Proben 6 Stunden lang im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Im Anschluß daran wurden zu jeder Probe 0.1 ml der Lösung mit dem 125-I-markierten Insulin gegeben und 18 Stunden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden die Proben mit 1.0 ml des oben beschriebenen Puffers verdünnt und 20 Minuten lang bei 3500 U/Min und 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Schritt haftete der Doppelantikörperkomplex am Boden der Röhrchen und der Überstand konnte abdekantiert werden. Mittels einer Wasserstrahlpumpe wurden teilweise noch an den Gläschen anhaftende Tröpfchen abgesaugt.

Gemessen wurden die Proben in einem automatischen Gamma-Counter. Die Zählzeit wurde so eingestellt, daß die Proben für den Nullpunkt der Eichkurve (die ja ausschließlich markiertes Insulin enthielten) eine Countzahl von etwa 6000 erreichten. Mit dieser Zählzeit, in der Regel eine Minute, wurden alle Proben gemessen.

3.3.3 Berechnung des sezernierten Insulins

Da jede Probe doppelt bestimmt wurde ließ sich eine Durchschnittszählrate ermitteln. Aus den Durchschnittszählraten der Proben und der Zählrate des Leerwerts wurde jeweils ein Quotient gebildet.

Für die Erstellung der Eichkurve wurde in derselben Weise verfahren.

Der Insulingehalt der Meßproben kann aus der graphischen Darstellung dieser Eichkurve direkt ermittelt werden.

In diesem Fall hier wurde ein Computerprogramm zu Hilfe genommen. Die Umrechnung vom Probevolumen (0.1 ml) auf das Inkubationsvolumen (0.7 ml) erfolgte durch den Faktor 7. Die Angaben erfolgen in uE IRI/ml

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 Vorversuche

Da im Arbeitskreis noch keinerlei Erfahrungen mit der Zentrifugationstechnik vorlagen mußte zunächst eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt werden.

4.1.1 Trennungsversuche

Als erstes galt es zu prüfen, ob bei der Verwendung des Siliconöls Versilube F 150 und Einhaltung der beschriebenen Versuchsbedingungen die gewünschte Trennung durch Zentrifugation auch möglich ist.

Zu diesem Zweck wurden 10 Inseln in nicht aktivem Inkubationsmedium im Zentrifugenröhrchen mit 150 ul Siliconöl bei 10000 Umdrehungen ca 20 Sekunden zentrifugiert. Nach der Trennung konnten im Überstand keine Inseln mehr gefunden werden. Sie waren vollständig durch das Öl hindurchgegangen und bildeten in der Spitze ein Pellet.

4.1.2 Aufschlußversuche

Um die aufgenommene Aktivität vollständig messen zu können ist ein Aufschluß der zentrifugierten Inseln notwendig. Üblicherweise werden hier Harnstofflösung oder Kalilauge verwendet. Da beide ein höheres spezifisches Gewicht als Siliconöl und Inkubationsmedium besitzen werden sie einfach in die Spitze der Röhrchen pipettiert. Die Inseln wandern beim Zentrifugieren in diese Lösung und werden zerstört.

Um hier eine Wahl treffen zu können wurde ein einfacher Test durchgeführt:
Jeweils 10 Inseln wurden ohne Beladung entweder mit Harnstofflösung oder mit Kalilauge in der Röhrchenspitze zentrifugiert. Unter dem Mikroskop wurde der Inhalt der abgeschnittenen Spitzen begutachtet.
Es stellte sich heraus, daß die 3 molare Kalilauge die Inseln am besten auflösen kann.

4.2 Auswahl der Isolierungsmethode für Langerhanssche Inseln

4.2.1 Untersuchung der Leucin-Aufnahme an kalt und warm isolierten Inseln.

Bereits 1971 betonte Lernmark die Notwendigkeit der Einhaltung physiologischer Temperaturen bei der Inselisolierung. Darüber hinaus hatten im Arbeitskreis durchgeführte Versuche zur Kaliumaufnahme in Langerhanssche Inseln gezeigt, daß die bisher gebräuchliche Isolierungsmethode unter Eiskühlung möglicherweise einige Schwächen aufweist. Die Temperatur bei der Isolierung hat nachgewiesenermaßen einen Einfluß auf die Ionenfluxe an der Membran (Wahl 1983).
Die Insulinsekretion, die als Vitalitätstest für die Inselzellen herangezogen wird, scheint hiervon allerdings nicht betroffen. (Mark u.Wahl 1983)

Um einen möglichen Einfluß der Isolierungsmethode auf die Aufnahme feststellen zu können, wurde eine Aufnahmekurve für warm und für kalt isolierte Inseln unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen erstellt.

4.2.1.1. Leucin-Aufnahme 1 uM kalt isoliert

Für diese Versuche wurden die Inseln wie in Teil 3 beschrieben unter Eiskühlung mit Hank$ Lösung gewonnen.
Gemessen wurde die Aufnahme nach 4, 12, 20, 30, 60 und 120 Minuten.
Aus 8 Versuchen wurde ein Mittelwert gebildet.

Tab.4.1

Aufnahme 14-C Leucin (1 yM) in 10 Inseln

Inkubationszeit (Min)	Aufnahme (%)	Aufnahme +/- SEM (fMol)
4	0.107	142 +/- 9.2
12	0.157	191 +/- 7.9
20	0.190	223 +/- 22
30	0.228	259 +/- 22
40	0.237	269 +/- 17.5
60	0.283	313 +/- 23
120	0.337	366 +/- 25.5

10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten in KRB-Hepes Puffer unter Zusatz von 1 yM ^{14}C Leucin inkubiert. Die Aufnahme ist angegeben in % der eingesetzten Gesamtaktivität und umgerechnet in fMol / 10 Inseln. Die Anzahl der Versuche war 8, die Meßergebnisse sind in Abb.4.1 dargestellt.

4.2.1.2 Leucin-Aufnahme in warm isolierte Inseln

Abweichend von der zuvor angewandten Isolierungstechnik wurde anstatt unter Eiskühlung von Anfang an bei Zimmertemperatur gearbeitet.

Diese Umstellung bringt noch weitere Änderungen mit sich:

1. Der bei niederen Temperaturen unterdrückte Stoffwechsel muß durch Albumin versorgt werden.
   Es wurde daher für Isolierung und Auslesen einheitlich KRB-Lösung mit 2% Rinderserumalbumin verwendet.

2. Bisher wurde die Kollagenase-Verdauung durch Zugabe von eisgekühlter Hanks Lösung gestoppt.
   Um die Kollagenase von den Inseln und dem verbliebenen exokrinen Gewebe zu trennen wurde ein Zentrifugationsschritt eingefügt. Dabei konnte die spezifisch leichtere Kollagenase abdekantiert werden. Durch dreimaliges Aufschwämmen und Abgießen wurde so die Verdauung unterbrochen.

Für die praktische Arbeit brachte die Umstellung einige Vorteile mit sich.So mußten nicht mehr verschiedene Medien angesetzt werden, die Probleme mit der Eiskühlung entfielen und durch die Abzentrifugation der Kollagenase wurde das Auslesen der Inseln erleichtert.

Tab.4.2

Aufnahme von Leucin in warm isolierte Langerhanssche Inseln

Inkubationszeit (Min)	Aufnahme (%)	Aufnahme (fMol)	+/- SEM
4	0.157	216	+/- 18
12	0.217	272	+/- 26
20	0.285	335	+/- 25.5
30	0.265	316.5	+/- 18.5
40	0.327	373	+/- 30.5
60	0.391	432.5	+/- 28
120	0.548	579	+/- 28.5

10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten in HEPES Puffer mit 1 yM 14-C Leucin inkubiert. Die Aufnahmewerte sind sowohl in % der Gesamtaktivität als auch in fMol/10 Inseln angegeben. Die Werte sind Mittelwerte aus 8 Versuchen +/- SEM.

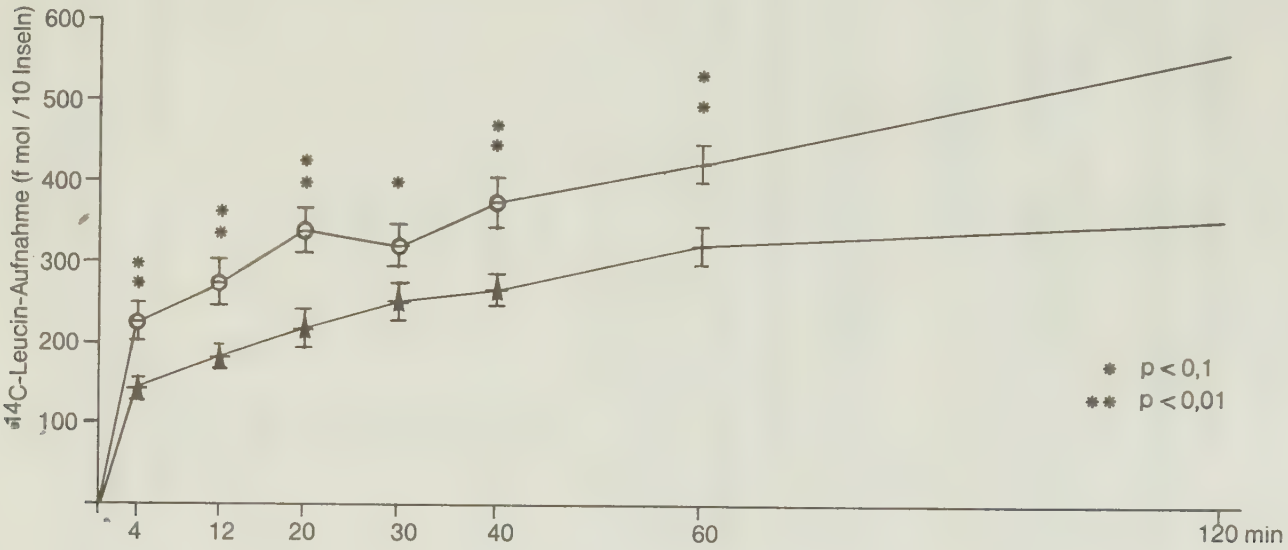
Die Ergebnisse sind in Abb.4.1 dargestellt.

4.2.1.3 Schlußfolgerungen

Wie Abbildung 4.1 zeigt, nehmen warm isolierte Inseln zu allen untersuchten Inkubationszeiten mehr 14-C Leucin auf als kalt gewonnene.

Die Differenz ist bei 30 Minuten signifikant ($p<0.1$), bei allen anderen Zeiten sogar hochsignifikant ($p<0.01$).

Abb. 4.1 Einfluß verschiedener Isolierungsmethoden auf die Leucinaufnahme der Langerhansschen Insel der Ratte



Jeweils 10 Inseln, entweder unter Eiskühlung ——▲—— oder bei Raumtemperatur ——o—— isoliert, wurden zwischen 4 und 120 Minuten in KR-Hepes-Puffer mit 14-C Leucin (1yM, spez.Akt. 336 Ci/Mol) inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte aus 8 Versuchen +/- SEM.

Mehr noch als die absoluten Werte sagen die Kurvenverläufe aus. Bei den warm isolierten Inseln ist der Anstieg während der ersten 20 Minuten deutlich steiler, das heißt, daß diese Inseln schneller Leucin aufnehmen als kalt isolierte.

Daraus kann man nur den Schluß ziehen, daß durch die Eiskühlung die Aktivität der Inselzellen beeinträchtigt oder doch zumindest ihr Ansprechen verlangsamt wird.

Dennoch fallen die Unterschiede nicht so groß aus, daß man von einer Schädigung der Inseln durch die Kaltisolierung sprechen kann.

Für die weiteren Versuche stellte sich nun die Frage, welche Isolierungsmethode angewandt werden sollte.
Ausschlaggebend für die Auswahl der warmen Technik war das schnellere Ansteigen des Leucin-Gehalts, da vor allem kurze Inkubationszeiten gemessen werden sollten.

4.3 Bestimmung des Extrazellulärraums

Um von Aufnahme in die Zelle sprechen zu können, muß der Anteil Substanz gemessen werden können, der tatsächlich durch die Zellmembran ins Zellinnere durchdringt. Bei der Insel haben wir keine Einzelzellen, sondern einen Zellverband vorliegen.
Stellt man sich die Insel als eine Packung kugelförmiger Einzelzellen vor, erkennt man schnell, daß zwischen den Zellen ein Freiraum existiert.

Dieser Raum wird als Extrazellulärraum bezeichnet.
Elektronenmikroskopische Bilder von kollagenaseverdauten Inseln zeigen, daß die Modellvorstellung den tatsächlichen Verhältnissen sehr nahe kommt. Ebenso zeigen diese Bilder, daß im Gegensatz zu mikrodissektierten Mäuseinseln keine Kapsel die Insel umgibt und der Raum mehr oder weniger frei zugänglich ist.

Das Problem bei den Aufnahmemessungen liegt darin, daß das Medium mit der radioaktiv markierten Substanz durch passive Diffusion in den Extrazellulärraum gelangt.
Bei der Zentrifugation wandert mit der Insel natürlich auch dieser Teil durch das Siliconöl und man findet in der Spitze nicht nur die von den Zellen aufgenommene sondern auch die im Extrazellulärraum verteilte Aktivität wieder.

Bei der Umrechnung der gemessenen Countzahlen erhält man folglich stets zu hohe Werte. Da der Extrazellulärraum eine feste Größe ist, läßt er sich bestimmen und in die Berechnung einbeziehen.

Zur Bestimmung des Extrazellulärraums wird radioaktive Sucrose verwendet. Diese Substanz kann bekanntlich die Zellmembran nicht durchdringen, wohl sich aber über den Extrazellulärraum verteilen.
Zahlreiche Autorn (Hellmann, 1971 , Malaisse, 1978 , Henquin, 1976) verwenden diese Technik und haben gezeigt, daß nach einer Verteilungszeit von ca. 4 Minuten die Aufnahme linear konzentrationsabhängig und unabhängig von der Inkubationszeit erfolgt.

Üblicherweise wird der Sucrosespace parallel zu den zu messenden Aufnahmen in Form einer Doppelmarkierung bestimmt. Diese Methode hat den Vorteil, daß beide Werte in einem Versuch bestimmt werden können.

Voraussetzung für die Messung einer solchen Doppelmarkierung ist allerdings eine genaue Kenntnis der Energieverhältnisse. Vor allem die Strahlungsenergien der verwendeten Isotope müssen ebenso genau ermittelt werden wie die Kanalbreiten des Zählgeräts, da vor allem im niederenergetischen Tritiumkanal stets ein Teil des anderen Isotops mitgemessen wird. Quencheffekte können diesen Vorgang noch erheblich verstärken.

Weniger aufwendig, und auch mit einfacherer Apparatur möglich ist es, die Sucroseaufnahme für die jeweilige Konzentration in einer eigenen Versuchsreihe zu bestimmen.

4.3.1 Aufnahmeversuche mit 1 uM Sucrose

Für die ersten Versuche mit 3-H markierter Sucrose wurde dieselbe molare und radioaktive Konzentration wie bei den Leucin-Versuchen verwendet.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zu den Leerwerten. Dies war zwar im Einklang mit früheren Ergebnissen in unserem Labor (Pfäffle 1983), nicht aber mit den verschiedenen Autoren, die einen extrazellulären Anteil, je nach eingesetzter Konzentration, zwischen 10 und 40 % finden. (Hellmann 1971, Mallaise 1978)

4.3.2 Aufnahme mit verschiedenen Sucrosekonzentrationen

Für die weiteren Versuche wurde die radioaktive Konzentration der Sucrose erhöht. Dadurch konnte der im Tritiumkanal höhere Zählverlust ausgeglichen und Werte für den Extrazellulärraum gemessen werden.

Da Sucrose sich etwas langsamer als andere Substanzen im Extrazellilärraum verteilt (Hellmann 1971) wurde eine Inkubationszeit von 20 Minuten gewählt.
Die Konzentrationen bewegten sich zwischen 1 uM und 10 mM, zu jeder Konzentration wurden 4 Versuche gemacht.

Folgende Werte, umgerechnet auf fMol/10 Inseln wurden gemessen:

Konzentration	Aufnahme
1 uMol/l	18.1 f Mol
10 uMol/l	128 f Mol
0.1 mMol/l	1.18 p Mol
1 mMol/l	12.0 p Mol
10 mMol/l	168 p Mol

Die Werte zeigen, daß die Aufnahme linear mit steigender Konzentration zunimmt. Die etwas größeren Abweichungen bei 1 uMol/l und 10 mMol/l liegen im Bereich der Streuung.

4.3.3 Schlußfolgerungen

Übereinstimmend mit anderen Autoren konnte mittels radioaktiv markierter Sucrose ein sogenannter Extrazellulärraum gemessen werden.

Die Angaben von Hellmann, die von einem linearen Verlauf im Bereich zwischen 1 und 25 mmolar sprechen konnten bestätigt und auf den mikromolaren Bereich erweitert werden.

4.4 Versuche zur Insulinsekretion

Die Versuche zur Insulinsekretion hatten zwei Ziele:

Zum einen sollte die Funktionstüchtigkeit der Inseln gemessen werden zum andern das Ansprechen auf verschiedene Leucin-Konzentrationen.

4.4.1 Vitalitätstest

Um zeigen zu können, daß die zu den Aufnahmeversuchen eingesetzten Inseln intakt sind, wurden sie 2 Stunden lang im Hauptinkubationsmedium inkubiert und anschließend einer 9o minütigen Sekretionsmessung unterzogen.

Als Stimulator wurde Glucose (16.7 mmolar) verwendet. (Kontrolle: 3 mmolar)

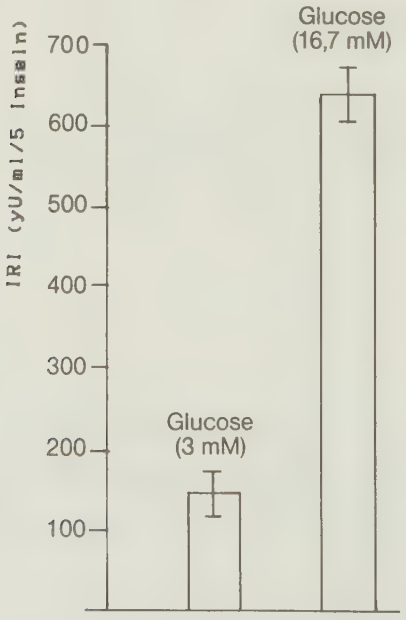
Ergebnisse

die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 15 Messungen

Angabe in uE/ml IRI in 5 Inseln +/- SEM

Medium		Insulinsekretion
KRB-Hepes	Glucose 3 mM	140.05 +/- 17.0
KRB-Hepes	Glucose 16.7 mM	634.13 +/- 35.7

Abb. 4.2 Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte.



5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten lang inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 15 Einzelwerten.

Schlußfolgerung

Isolierte Langerhanssche Inseln sind in der Lage nach zweistündiger Inkubation in KRB-Hepes-Medium auf einen Glucosereiz hin Insulin zu sezernieren.
Dies ist ein Beweis dafür, daß die für Aufnahmeversuche verwendeten Inseln intakt sind.

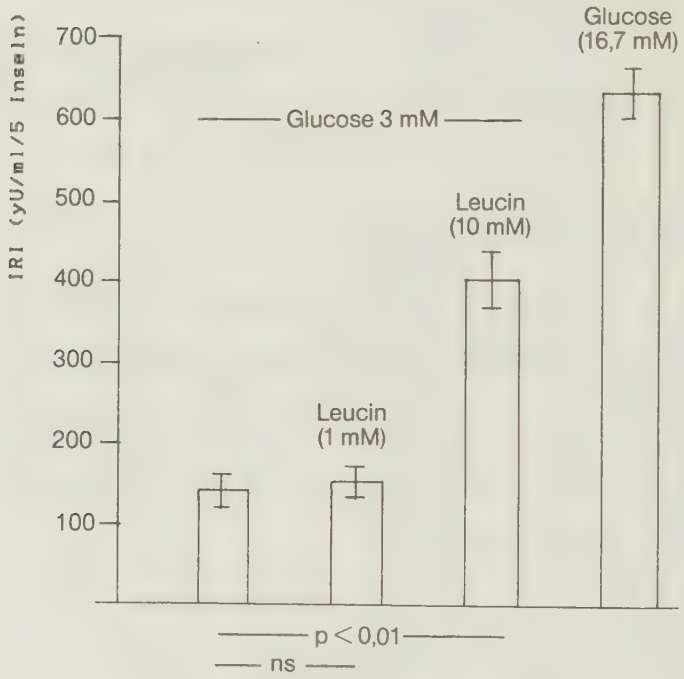
4.4.2 Stimulation durch Leucin

Bei früheren Untersuchungen im Arbeitskreis zur Aufnahme von Leucin in Langerhanssche Inseln hatte sich eine Sättigung der Aufnahme im Bereich zwischen 1 und 10 mmolar angedeutet. Aus diesem Grund sollte hier neben der bekannten Stimulation durch 10 mM Leucin eine mögliche (minimale) Stimulation durch bereits 1 mM Leucin untersucht werden.

Ergebnisse

	(uE IRI/ml/5 Inseln) +/- SEM
Glucose 3 mM	140.05 +/- 17.0
Glucose 3 mM + Leucin 1 mM	157.85 +/- 17.5
Glucose 3 mM + Leucin 10 mM	398.05 +/- 35.8
Glucose 16.7 mM	634.13 +/- 35.8

Abb.4.3 Einfluß von Leucin auf die Insulinsekretion der Langerhansschen Insel der Ratte



5 Inseln wurden 90 Minuten in KRB-Hepes mit verschiedenen Glucose- und Leucinkonzentrationen inkubiert.
Angegeben sind Mittelwerte aus 15 Messungen +/- SEM

Schlußfolgerung

Die Inkubation mit 10 mM Leucin zeigt die bekannte Stimulation der Insulinsekretion, während eine 90 minütige Inkubation unter Zusatz von 1 mM Leucin die Sekretion nur minimal (nicht signifikant) gegenüber der Kontrolle erhöht.

5 ERGEBNISSE

5.1 Leucin - Aufnahmen

Frühere Versuche im Arbeitskreis zum Thema Leucin hatten noch einige Fragen bezüglich der Aufnahme offengelassen. Es war festgestellt worden, daß die Aufnahme nicht linear mit steigender Konzentration zunimmt. Dies hatte zu der Vermutung geführt, daß möglicherweise schon im Bereich zwischen 10 uM und 0.1 mM eine Sättigung der Aufnahme einsetzt.

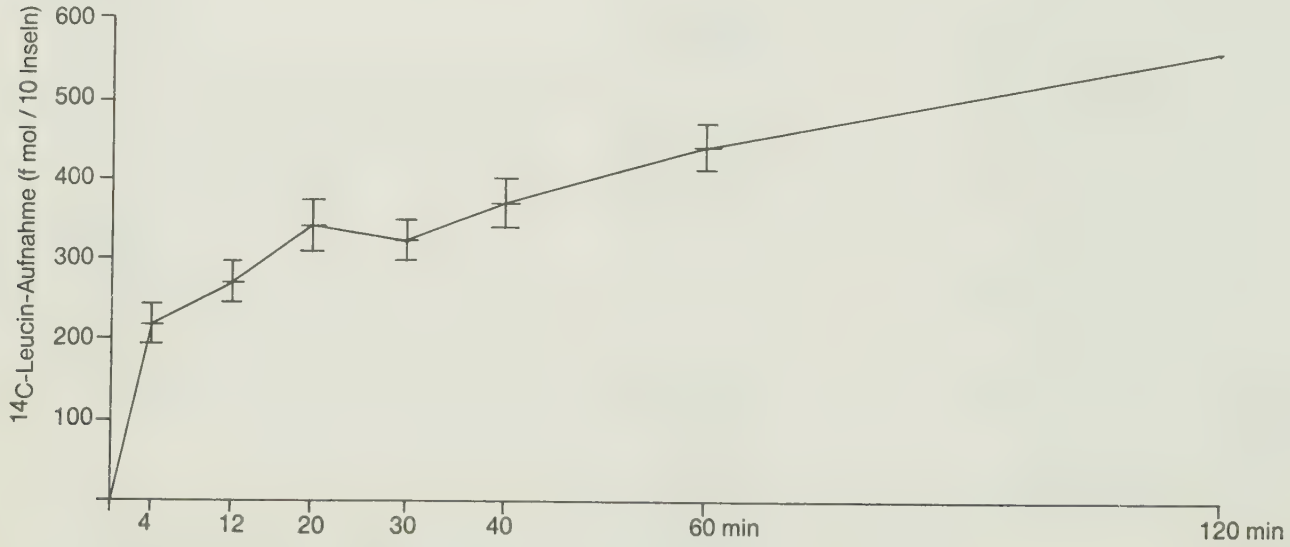
5.2 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme

Gemessen wurde die Leucin-Aufnahme in 10 Inseln zu verschiedenen Zeiten mit verschiedenen Leucin-Konzentrationen im Medium.

5.2.1 Leucin 1 uM

10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten in Inkubationsmedium mit 1 uM/l radioaktivem Leucin inkubiert.
Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus 8 Messungen, umgerechnet in fMol bzw. pMol +/- SEM angegeben.

Abb. 5.1 Aufnahme von Leucin in die Langerhanssche Insel der Ratte.



10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten mit 14-C Leucin (1yM, spez.Akt. 336 Ci/Mol) inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 8 Versuchen.

Tab.5.1

Aufnahme 1 uM Leucin

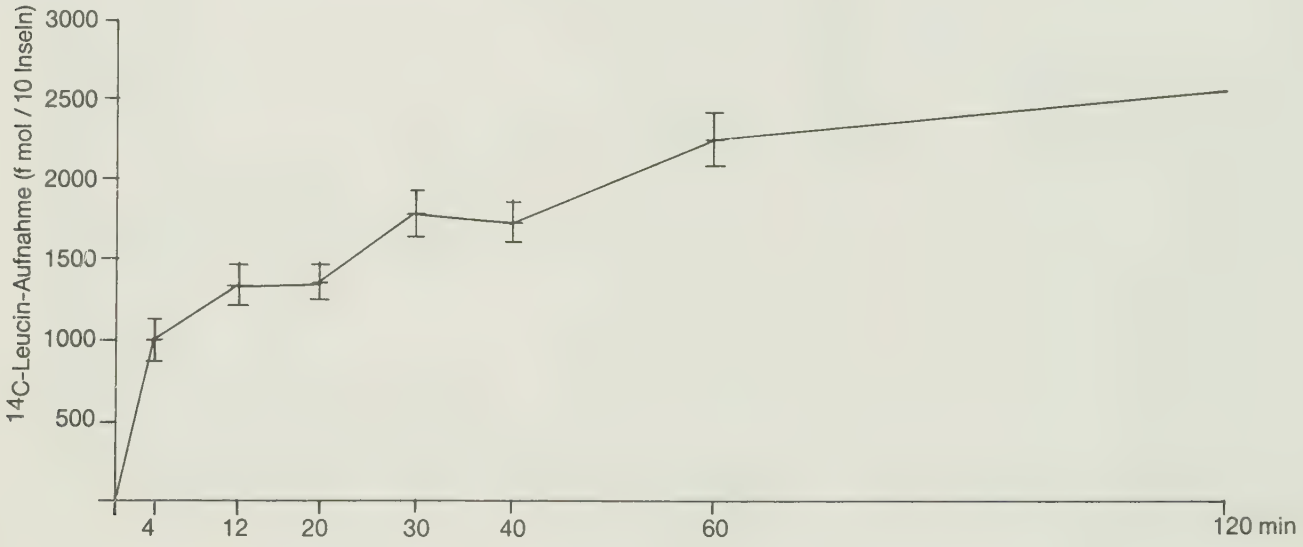
Inkubationszeit (Min)	Aufnahme (fMol)	+/- SEM
4	216.5	+/- 18
12	272	+/- 26
20	335	+/- 25.5
30	316.5	+/- 18.6
40	373	+/- 30.5
60	432.5	+/- 28
120	579	+/- 28.5

Da hier die Gesamtaufnahme gemessen wurde muß im Einzelfall noch der Extrazellulärraum berücksichtigt werden. Die einzelnen Werte vermindern sich für diese Konzentration um 14.5 f Mol d.h. der Extrazellulärraum ist hier so gering, daß er in der Streuung untergeht.

5.2.2 Leucin 10 uM

10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt eine Mischung aus radioaktiv markiertem und unmarkiertem Leucin. Durch einen Multiplikationsfaktor wurde bei der Berechnung vom 14-C-Leucin auf Gesamtleucin umgerechnet.

Abb. 5.2 Leucinaufnahme in die Langerhanssche Insel der Ratte



10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten mit 14-C Leucin (10 yM, spez.Akt. 336 Ci/Mol) inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 8 Versuchen

Tab.5.2

Aufnahme 10 uM Leucin

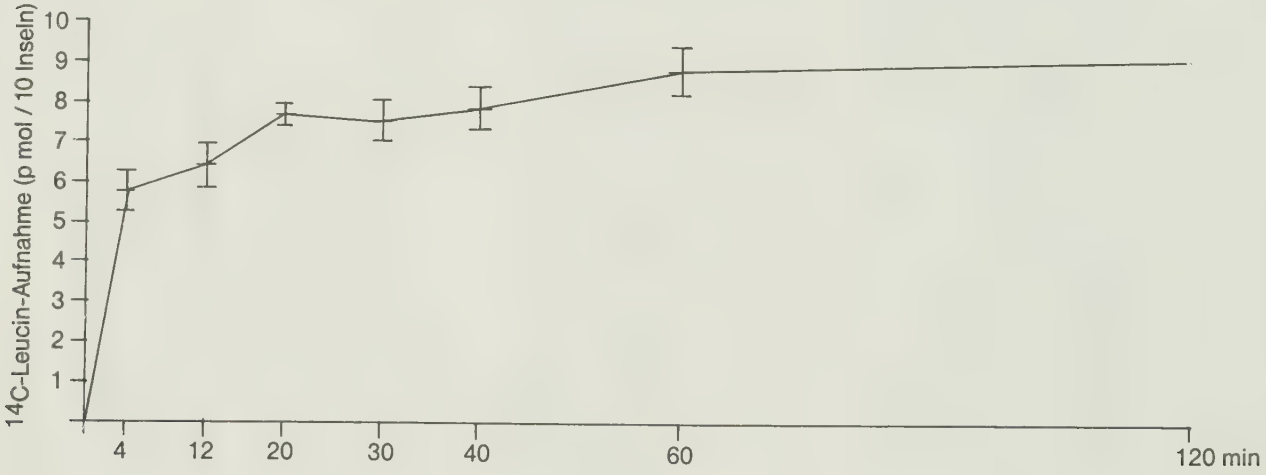
Inkubationszeit (Min)	Aufnahme (fMol)	+/- SEM
4	997	+/- 48
12	1353	+/- 64
20	1401	+/- 55
30	1799	+/- 81
40	1737	+/- 82
60	2196	+/- 92
120	2710	+/- 176

10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten in KRB-Hepes Puffer unter Zusatz von 14-C Leucin (10 yM) inkubiert. Die Aufnahmen sind als Mittelwerte aus 8 Versuchen angegebenin fMol / 10 Inseln +/- SEM.

Der Extrazellulärraum beträgt 145 fMol

Darstellung: Abb.5.2

Abb. 5.3 Leucinaufnahme in die Zellen der Langerhansschen Insel der Ratte.



10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten in KR-Hepes Puffer mit 14-C Leucin (0.1 mM, spez.Akt.336 Ci/Mol) inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 8 Versuchen.

5.2.3 Leucin 0.1 mM

Tab.5.3

Inkubationszeit (Min)	Aufnahme (pMol)	+/- SEM
4	5.74	+/- 0.46
12	6.37	+/- 0.60
20	7.68	+/- 0.30
30	7.57	+/- 0.53
40	7.90	+/- 0.43
60	8.77	+/- 0.85
120	9.06	+/- 0.66

10 Inseln wurden zwischen 4 und 120 Minuten in KRB-Hepes unter Zusatz von 0.1 mM 14-C Leucin inkubiert. Die Aufnahmen sind angegeben in pMol/10 Inseln +/- SEM und sind Mittelwerte aus 8 Versuchen.

Der mit Sucrose bestimmte Extrazellulärraum beträgt für diese Konzentration 1.45 pMol

Darstellung in Abb. 5.3

5.2.4 Ergebnisse

In allen drei Konzentrationen (1 yM, 10 yM, 100 yM) erfolgt rasche Aufnahme von Leucin in die Zellen der Langerhansschen Inseln der Ratte. Halbmaximale Werte werden bereits nach ca. 5 Minuten erreicht, eine Sättigung tritt zwischen 60 und 120 Minuten ein.

5.2.5 Schlußfolgerung

Betrachtet man nun die verschiedenen Konzentrationen bei gleichen Inkubationszeiten so fällt auf, daß die Aufnahme nicht in demselben Maß zunimmt wie die Konzentration im Medium erhöht wird. Dadurch fällt auch der extrazelluläre Anteil, der ja linear mit der Konzentration zunimmt, verschieden aus.
Während er bei 1 uM mit 3% vernachlässigbar klein ist, beträgt er bei 0.1 mM Leucinkonzentration schon 16.5 % (jeweils bei 60 Minuten Inkubation).

5.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Um eine mögliche Aufnahmesättigung im mikromolaren Bereich beweisen zu können waren weitere Versuche mit höheren Konzentrationen notwendig.

5.3.1 Leucin-Aufnahme mit verschiedenen Konzentrationen

Aus technischen Gründen konnten diese Versuche mit den zum Teil sehr hohen Konzentrationen und dem damit verbundenen hohen Verbrauch an radioaktiv markiertem Material nur mit einer Inkubationszeit durchgeführt werden.

Tab.5.4

Konzentration im Medium	Aufnahme Leucin (pM) +/- SEM	
1 uM	0.331	+/- 0.02
10 uM	2.945	+/- 0.20
0.1 mM	12.28	+/- 0.96
1 mM	69.71	+/- 5.95
10 mM	118.2	+/- 24.8

10 Isseln wurden 60 Minuten lang in KRB-Hepes unter Zusatz verschiedener Konzentrationen an 14-C Leucin inkubiert. Die gemessenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Versuchen und angegeben in pMol/10 Inseln +/- SEM. Die Werte sind um den sogenannten Sucrose-space korrigiert und in Abb. 5.4 in doppelt logarithmischer Form aufgezeichnet

5.3.2 Ergebnis

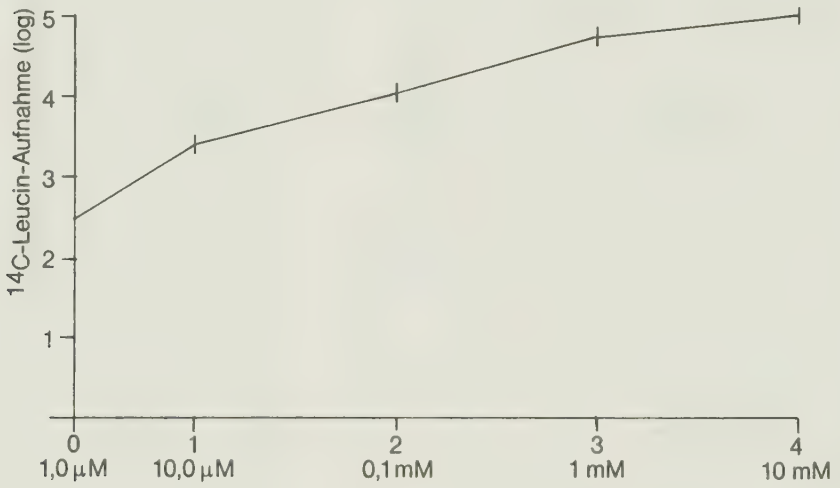
Im Bereich zwischen 1 yM und 1 mM besteht Linearität zwischen eingesetzter Konzentration im Medium und aufgenommener Menge an Leucin. Eine jeweils zehnfache Konzentrationserhöhung hat aber jeweils nur eine fünffach höhere Aufnahme zur Folge.

Die Steigerung von 1 mM auf 10 mM führt nur noch zu einer um das 1.5 fache gesteigerten Aufnahme. Dies deutet auf eine Sättigung der Aufnahme in diesem Bereich hin.

Um dies sicher beweisen zu können müßten noch höhere Konzentrationen untersucht werden. Aus den oben beschriebenen Gründen ist das mit diesem System leider nicht sinnvoll möglich.

Abb. 5.4 Leucinaufnahme in die Langerhanssche Insel der Ratte :

Konzentrationsabhängigkeit



10 Inseln wurden 60 Minuten lang mit Konzentrationen von 1 yM bis 10 mM 14-C Leucin (spez.Akt. 336 Ci/Mol) in KR-Hepes inkubiert. Die Mittelwerte aus 6 Versuchen sind logarithmisch aufgetragen. Die Werte sind um den "Sucrose space" korrigiert.

5.4 Aufnahme von Glutathion

Bei den bisherigen Arbeiten im Arbeitskreis war allgemein angenommen worden, daß reduziertes Glutsthion nicht von der Inselzelle aufgenommen wird.
Experimentell war diese Annahme allerdings bisher nicht untermauert worden.

5.4.1 Versuchsvorbereitung

Die Hauptprobleme bei der Arbeit mit GSH sind durch die Substanz selbst gegeben. Das größte Problem ist wohl die schnelle Oxidation, der die Substanz bei Inkubationsbedingungen unterliegt.
Um im Medium einen überwiegenden Anteil an reduziertem GSH zu haben, wurden wie bei den früheren Versuchen im Arbeitskreis zur Insulinsekretion die Inkubationszeiten auf 10 Minuten festgesetzt.
Nach 10 Minuten unter Inkubationsbedingungen können noch 88.4 % des ursprünglichen Thiolgehalts in der Lösung nachgewiesen werden, während es nach 60 Minuten nur noch 28 % sind (Enz 1984).

Da die Substanz auch unter Eiskühlung oxidiert, mußten die Lösungen unmittelbar vor dem Versuch zubereitet werden.
Das zweite Problem liegt darin, daß GSH ja aus drei Untereinheiten (Glycin, Cystein und u-Glutamylrest) aufgebaut ist.

Um nun genauere Aussagen über möglicherweise aufgenommene Bruchstücke machen zu können wäre eine Dreifachmarkierung unumgänglich gewesen.

Für die Frage, ob GSH als Ganzes durch die Zellmembran geht genügte zunächst eine 3-H-Markierung am Glycin.

5.4.2 Aufnahme von (2-^{3}H Glycin-)Glutathion

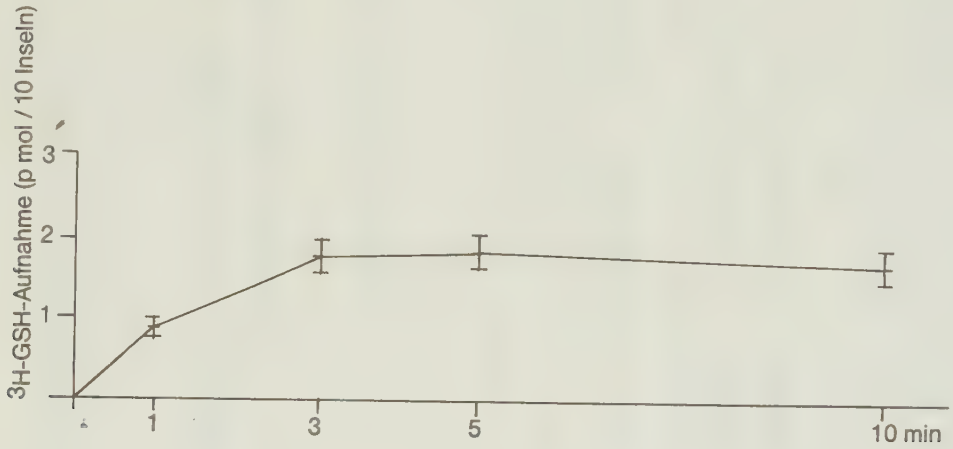
Tab.5.5

Aufnahme 0.1 mM GSH

Inkubationszeit (Min)	Aufnahme GSH (pM)	+/- SEM
1	0.937	+/- 0.023
3	1.859	+/- 0.121
5	1.871	+/- 0.139
10	1.765	+/- 0.140

10 Inseln wurden in KRB-Hepes Puffer mit 0.1 mM GSH zwischen 1 und 10 Minuten inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte aus 6 Versuchen +/- SEM und sind angegeben als pMol/10 Inseln.
Darstellung in Abb.5.5

Abb. 5.5 Glutathionaufnahme in die Zellen der Langerhansschen Insel der Ratte.



10 Inseln wurden zwischen 1 und 10 Minuten in KR-Hepes Puffer mit 3-H GSH (0.1 mM, spez.Akt. 892 Ci/Mol) inkubiert. Angegeben sind die gemessenen Gesamtaktivitäten als Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen.

Die Werte bei 3, 5 und 10 Minuten sind nicht signifikant verschieden.

Der bei 1 Minute etwas tiefere Wert läßt sich mit der zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossenen Verteilung begründen.

Wie Abb. 5.6 zeigt unterscheiden sich alle mit GSH gemessenen Aufnahmen nicht signifikant von dem mit Sucrose gemessenen Wert.

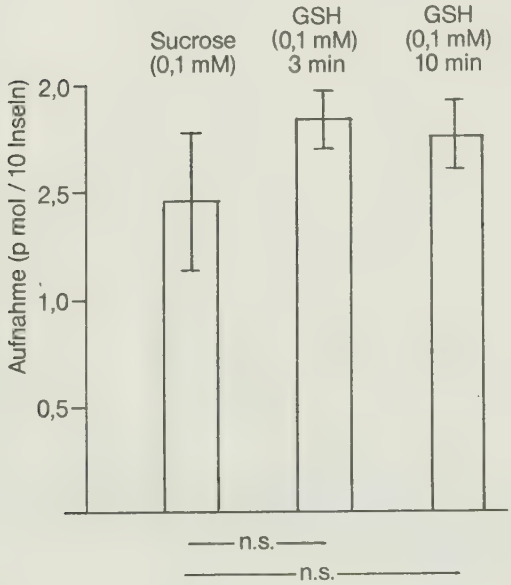


Abb.5.6 10 Inseln wurden 5 bzw. 10 Minuten in KR-Hepes mit 0.1 mM 3-H GSH inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen, Standard ist Sucrose.

5.4.3 Aufnahmeversuch mit hoher radioaktiver Konzentration

Bei der oben verwendeten GSH-Konzentration von 0.1 mM mußte aus technischen Gründen mit einem Gemisch aus markiertem und unmarkiertem GSH gearbeitet werden.

Da durch dieses "Verschneiden" die Meßempfindlichkeit herabgesetzt wird, wurde ein weiterer Versuch mit rein radioaktiver Substanz in einer Konzentration von 1 uM durchgeführt.

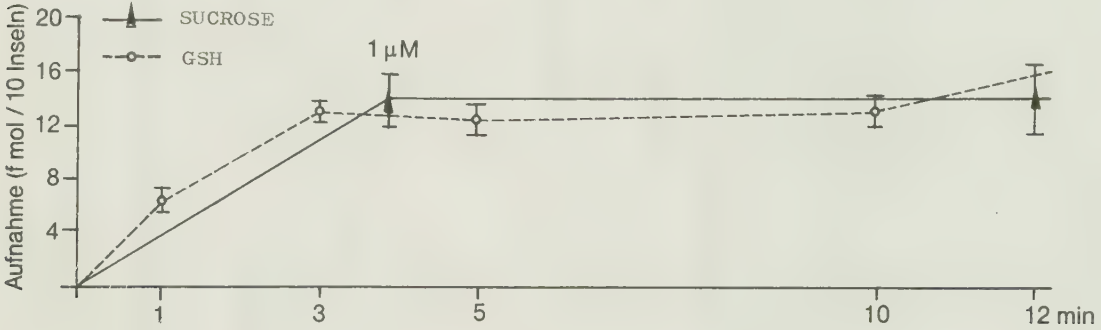
Tab. 5.6

Aufnahme 1 uM GSH

Inkubationszeit (Min)	Aufnahme GSH (FMol)	+/- SEM
1	6.76	+/- 1.4
3	13.32	+/- 1.16
5	12.82	+/- 2.53
10	13.64	+/- 2.94

10 Inseln wurden unter Zusatz von 3-H GSH (1 yM) 10 Minuten in KRB-HEPES inkubiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuche

Abb. 5.7 Vergleich der Verteilung von GSH und Sucrose über den Extrazellulärraum der Langerhansschen Insel der Ratte.



10 Inseln wurden zwischen 1 und 12 Minuten entweder mit 3-H Sucrose (1 yM, spez.Akt. 9800 Ci/Mol) oder GSH (1yM, spez.Akt. 892 Ci/Mol) inkubiert.
Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 4 Versuchen

5.4.4 Ergebnis

Wie aus Abb.5.7 leicht zu ersehen ist besteht auch hier kein Unterschied zwischen GSH und Sucrose.
Berechnet man die reinen Aufnahmen abzüglich des Extracellulärraums erhält man Nullwerte.

Da hier in einem sehr empfindlichen Bereich gearbeitet wurde, ist sicher, daß während einer Inkubationszeit von 10 Minuten kein reduziertes Glutathion und auch kein abgespaltenes Glycin von der Inselzelle aufgenommen wird.

5.5 Aufnahme von N-Acetyl-Cystein

5.5.1 Versuchsdurchführung

N-Acetyl-Cystein potenziert die Insulinsekretion im selben Konzentrationsbereich wie Glutathion.
Aus diesem Grunde wurden die Aufnahmeversuche mit 14-C N-Acetylcystein unter denselben Versuchsbedingungen wie die vorausgegangenen GSH-Aufnahmestudien durchgeführt.

5.5.2 Ergebnisse

Tab 5.7

Aufnahme von N-Acetylcystein in Langerhanssche Inseln

Inkubationszeit	Aufnahme NAC	+/- SEM
1 Min.	1.81	0.15
3 Min.	1.71	0.19
5 Min	1.40	0.05
10 Min.	1.33	0.18

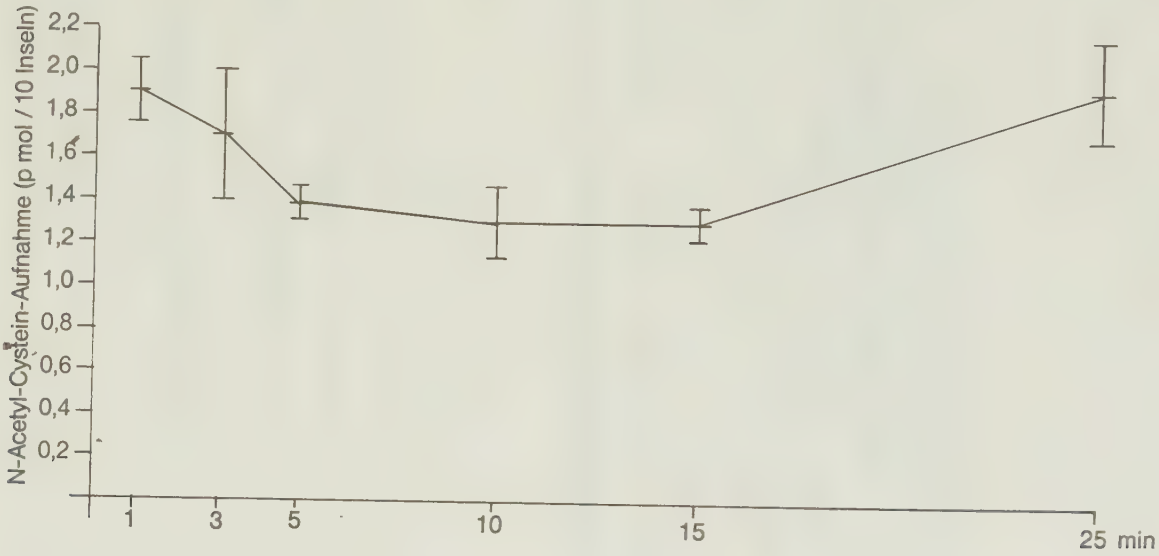
10 Inseln wurden unter Zusatz von 0.1 mM 14-C N-Acetylcystein 10 Minuten lang inkubiert. Die Werte sind angegeben als pMol/10 Inseln und repräsentieren Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen.

Darstellung Abb. 5.7

Vergleicht man die Werte mit dem mittels Sucrose gemessenen Standard stellt sich heraus, daß auch N-Acetylcystein nicht von den Zellen der Langerhanschen Inseln aufgenommen werden.

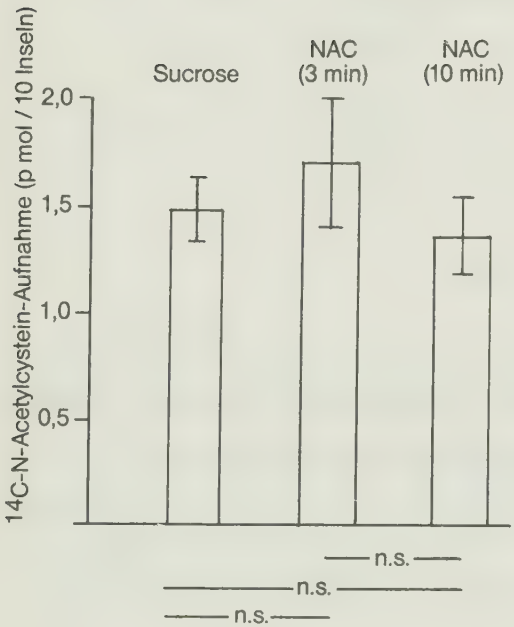
Die einzelnen Werte weichen nicht signifikant vom Standard ab und auch die Kinetik läßt eindeutig auf Nicht-Aufnahme schließen.

Abb. 5.8 Aufnahme von N-Acetyl-Cystein in die Langerhanssche Insel der Ratte.



10 Inseln wurden zwischen 1 und 25 Minuten in KR-Hepes Puffer mit 14-C N-Acetylcystein (0.1 mM, spez.Akt. 6.5 Ci/Mol) inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen.

Abb. 5.9 Aufnahme von N-Acetylcystein im Vergleich mit Sucrose



10 Inseln wurden 3 bzw. 10 Minuten in KR-Hepes Puffer mit 0.1 mM 14-C NAC (spez.Akt.6.5 Ci/Mol) inkubiert.

Als Referenz dient der mit Sucrose gemessene Wert für den Extrazellulärraum. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen

5.6 Aufnahme von Cystein

L-Cystein steigert die durch Glucose (11.1 mM) induzierte Insulinsekretion dosisabhängig in einem Bereich zwischen 3 und 7 mM Unterhalb der Schwellenkonzentration (zwischen 0.05 und 2 mM getestet) von 3 mM zeigt sich keine Wirkung (Ammon 1984).

Um einen möglichen Zusammenhang feststellen zu können wurde die Aufnahme in die Zellen der Langerhansschen Insel gemessen.

5.6.1 Versuchsdurchführung

Um unter der Schwellenkonzentration zu bleiben und Vergleichsmöglichkeiten mit Leucin (Aufnahme) und Sucrose (keine Aufnahme) zu haben wurde eine Konzentration von 1 mM gewählt.
Auch Cystein ist eine Substanz, die unter Inkubationsbedingungen rasch oxidiert. So finden sich nach 10 Minuten Inkubation nur noch 90.1 % des ursprünglichen Thiolgehalts im Medium wieder (Enz 1984).
Aus diesem Grund wurden wie schon zuvor bei den Versuchen mit GSH die Lösungen jeweils frisch bereitet.

Tab.5.8

Aufnahme 1 mM Cystein

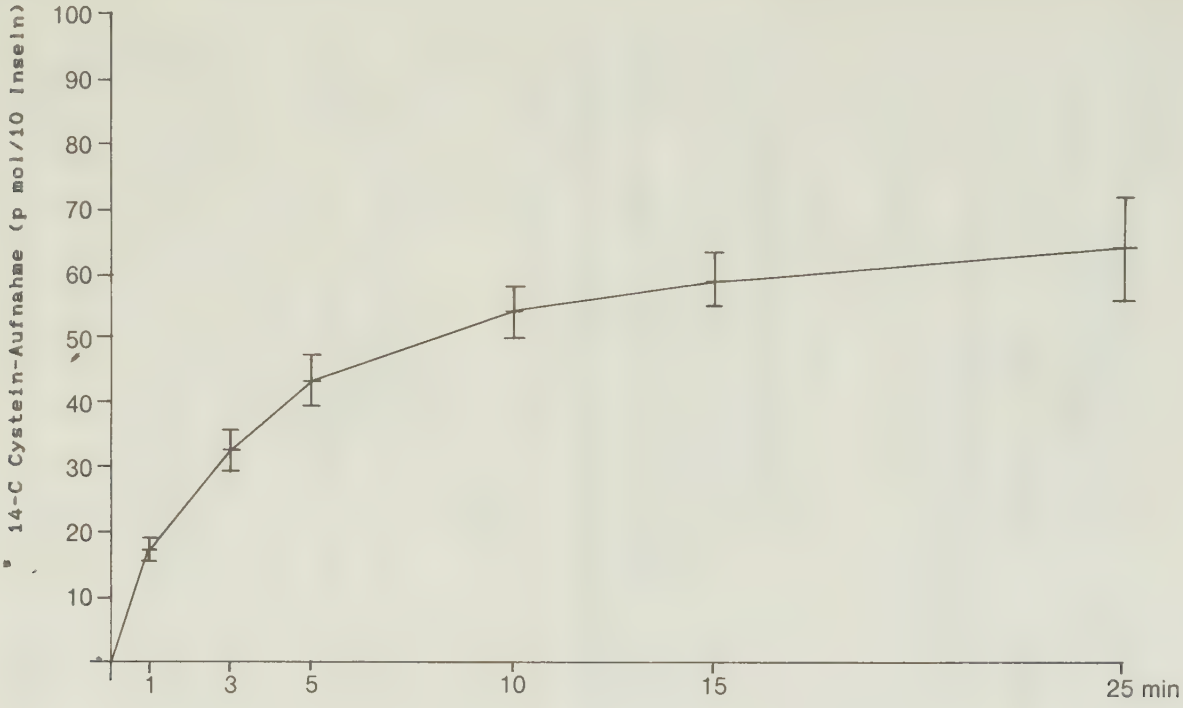
Aufnahmezeit (Min)	Aufnahme Cystein (pMol)	+/- SEM
1	32.02	+/- 1.39
3	46.40	+/- 2.62
5	57.30	+/- 3.38
10	68.77	+/- 4.03
15	73.63	+/- 3.50
25	78.68	+/- 7.82

10 Inseln wurden unter Zusatz von 14-C Cystein 10 Minuten in KRB-Hepes Puffer inkubiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Versuchen +/- SEM, die Angaben erfolgen in pMol/10 Inseln. Für absolute Aufnahmewerte muß noch ein extrazellulärer Gehalt in Höhe von 14.5 pMol/10 Inseln abgezogen werden.
Die Werte sind in Abb.5.10 dargestellt.

5.6.2 Ergebnis

Die Kurve zeigt eine rasche Aufnahme in die Insel.
Da sich nach 25 Minuten Inkubation bereits deutlich eine Sättigung der Cystein-Aufnahme abzeichnet ist ein Vergleich mit den beim Leucin (Inkubation 60 Minuten) gewonnenen Meßwerten möglich.

Abb. 5.10 Aufnahme von Cystein



10 Inseln wurden zwischen 1 und 25 Minuten in KR-Hepes Puffer mit 1 mM 14-C Cystein (spez.Akt. 35 Ci/Mol) inkubiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen. Sie sind um den mit Sucrose gemessenen Extrazellulärraum in Höhe von umgerechnet 14.6 pMol korrigiert.

Berücksichtigt man in beiden Fällen den extrazellulären Anteil so erhält man

für Cystein : 64.18 +/- 7.8 pMol/10 Inseln

und für Leucin : 69.78 +/- 5.9 pMol/10 Inseln

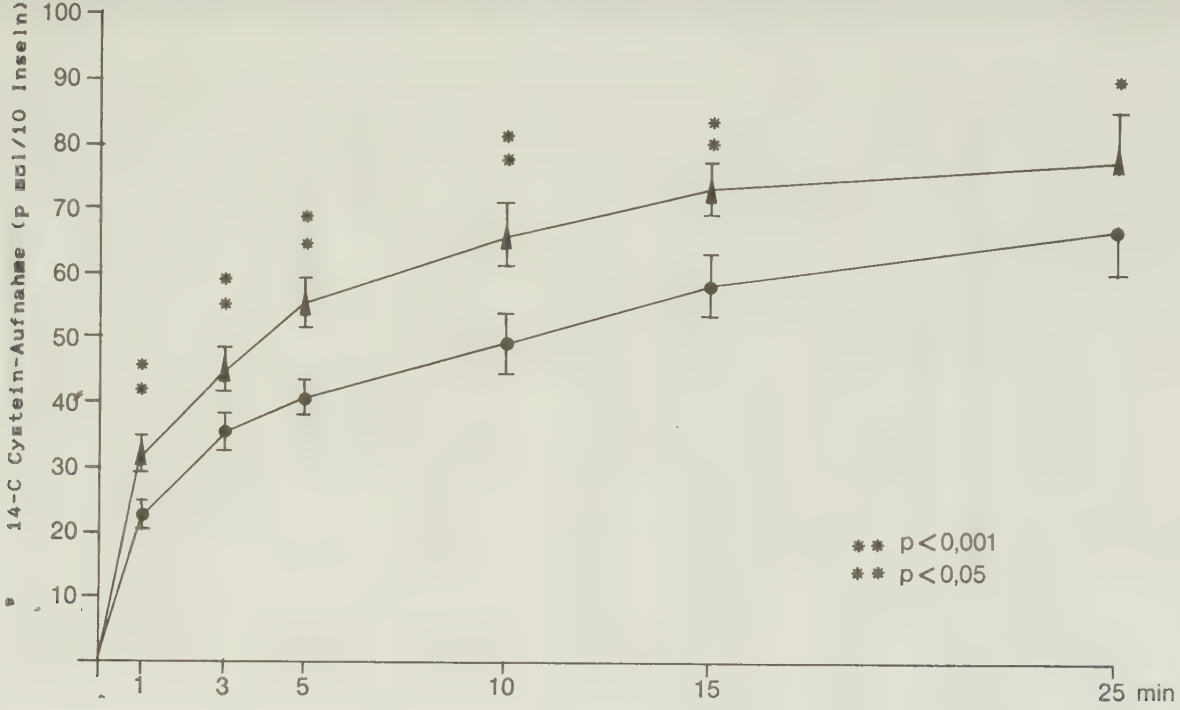
Die beiden Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Cystein wird folglich in einer mit Leucin vergleichbaren Weise von den Zellen der Langerhansschen Insel aufgenommen.

5.6.3 Hemmung der Cystein-Aufnahme durch Serin-Borat

Der von Meister in zahlreichen Publikationen beschriebene y - Glutamyl - Zyklus stellt nach seinen Aussagen ein Aufnahmesystem für Aminosäuren dar.
Eine mögliche Beteiligung der an der Insel nachgewiesenen y - Glutamyl - Transpeptidase (Malaisse 1981) an der Aufnahme von Cystein sollte hier untersucht werden.
Dieses Schlüsselenzym für den Meister-Zyklus läßt sich durch 5 mM Serin in Kombination mit 5 mM Natriumtetraborat im Medium selektiv hemmen (Tate 1978, Dethmers u. Meister 1981).

Borat.



10 Inseln wurden zwischen 1 und 25 Minuten in KR-Hepes Puffer mit 1 mM 14-C Cystein (spez.Akt 35 Ci/Mol) mit ● und ohne ▲ Zusatz von 5 mM L-Serin und 5 mM Natriumtetraborat inkubiert.
Die Werte (Mittelwerte +/- SEM) stammen aus 6 Versuchen.

5.6.3.1 Versuchsdurchführung

Für diese Versuchsreihe wurden die Konzentrationen und Inkubationszeiten der vorausgegangenen Versuche übernommen. Zur Aufnahmekurve mit 1 mM Cystein kam zusätzlich eine zweite mit ebenfalls 1 mM Cystein unter Zusatz von 5 mM Serin-Borat.

5.6.3.2 Ergebnisse

Es ergibt sich eine signifikante Hemmung der Aufnahme bei 1, 3, 5, 10 und 15 Minuten ($p<0.001$) durch den Zusatz von Serin-Borat.

Darstellung siehe Abb.5.11

5.6.4 Vergleich Serin-Borat / Serin

Um sicherstellen zu können, daß die verminderte Aufnahme auf eine Hemmung des y-Glutamyl-Zyklus zurückzuführen ist mußte ausgeschlossen werden, daß Cystein und Serin möglicherweise um ein und denselben Aufnahmemechanismus konkurieren.
Serin hemmt nur in Verbindung mit Natriumtetraborat die y-Glutamyl-Transpeptidase. Ohne Boratzusatz besitzt Serin keine Hemmwirkung auf das Enzym (Meister 1981)

5.6.4.1 Versuchsdurchführung

Bei dieser Meßreihe wurden drei Inkubationen (mit Serin und Borat, nur mit Serin und ohne Zusatz) parallel durchgeführt.

Auf die Messung vollständiger Aufnahmekurven wurde hier bewußt verzichtet und nur bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten gemessen. Bei dieser Zeit war in den vorangegangenen Versuchen die maximale Hemmung durch Serin-Borat zu beobachten gewesen.

5.6.4.2 Ergebnisse

Tab. 5.9

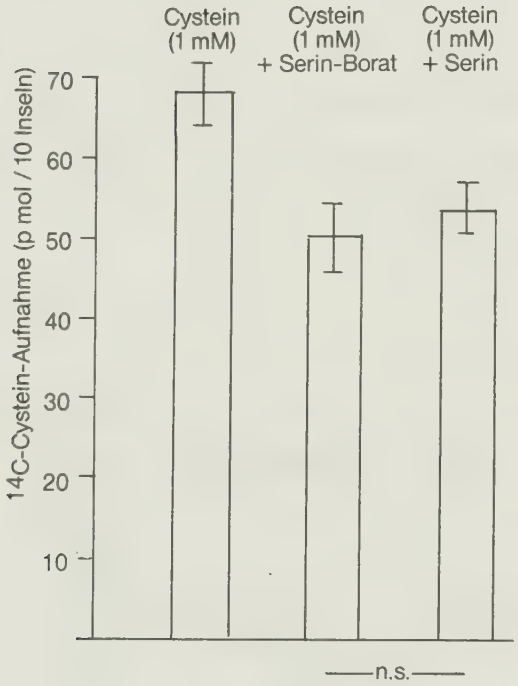
Aufnahme Cystein

	pMol +/- SEM
Cystein	68.8 +/ 4.0
Cystein + Serin + Borat	50.3 +/- 3.8
Cystein + Serin	52.6 +/- 4.3

10 Inseln wurden mit 1 mM 14-C Cystein in KRB-Hepes 10 Minuten lang inkubiert. Wahlweise wurde Serin (o.5 mM) oder Serin-Borat (0.5 mM) zugesetzt. Die Angaben sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen; Darstellung Abb.5.12

Zwischen den mit und ohne Boratzusatz gemessenen Werten besteht kein signifikanter Unterschied, beide Werte liegen aber deutlich unter dem ohne Zusatz gemessenen Vergleichswert.
Serin besitzt also auch ohne den für die Enzymhemmung notwendigen Boratzusatz einen Hemmeffekt auf die Cystein-Aufnahme der Inselzelle.

Abb. 5.12 Aufnahme von Cystein mit Serin bzw. Serin-Borat.



10 Inseln wurden 10 Minuten lang in KR-Hepes Puffer mit 1 mM 14-C Cystein (spez.Akt. 35 Ci/Mol) sowohl mit 5 mM L-Serin als auch mit 5 mM L-Serin + 5 mM Natriumtetraborat inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen.

5.7 Aufnahme von Glutamin

Um die bei den Versuchen mit Cystein gewonnenen Erkenntnisse zu untermauern wurde Glutamin als zweite Aminosäure herangezogen. zeigen.

5.7.1 Aufnahmekinetik von Glutamin

Zunächst wurde eine Aufnahmekurve für Glutamin in einer Konzentration von 0.1 mM erstellt.

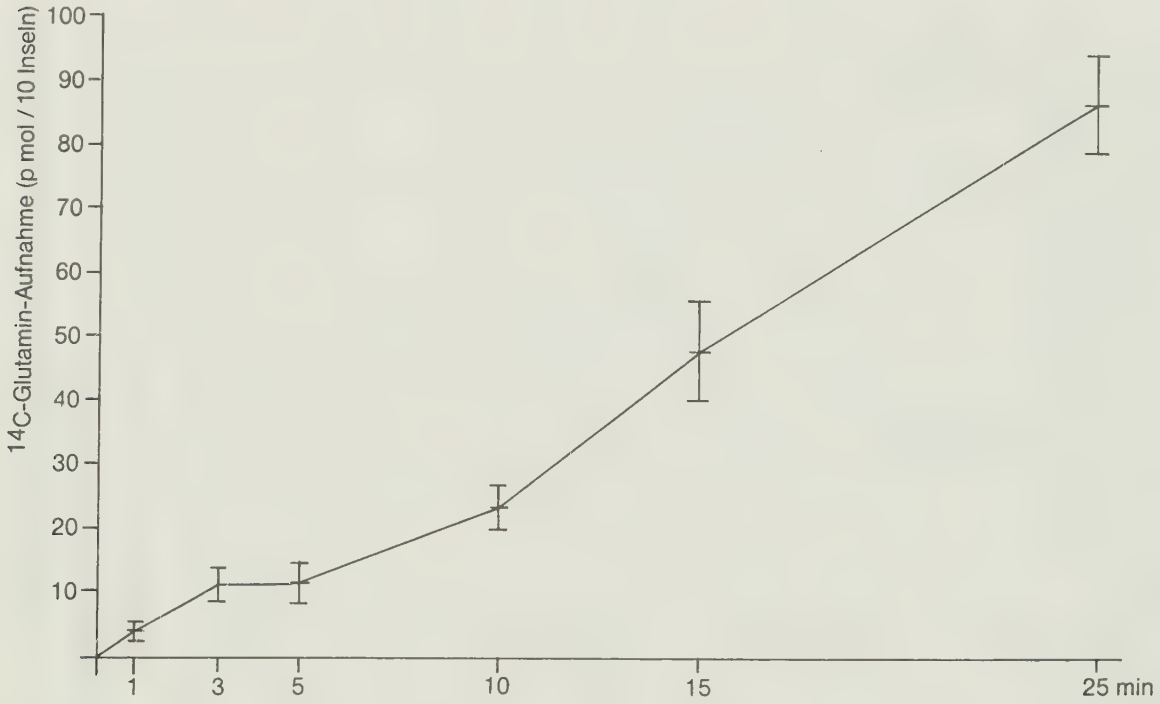
Tab. 13

Aufnahme von Glutamin

Inkubationszeit (Min)	Aufnahme (pMol)	+/- SEM
1	3.7	0.46
3	10.7	0.86
5	10.6	1.24
10	22.9	2.64
15	48.2	8.0
25	86.4	9.3

10 Inseln wurden zwischen 1 und 25 Minuten unter Zusatz von 0.1 mM Glutamin in KRB-Hepes Puffer inkubiert. Die Werte sind angegeben als pMol/10 Inseln und sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen. Darstellung Abb. 5.13

Abb. 5.13 Aufnahme von Glutamin in die Langerhanssche Insel der Ratte.



10 Inseln wurden zwischen 1 und 25 Minuten in KR-Hepes Puffer unter Zusatz von 14-C Glutamin (0.1 mM, spez.Akt. 280 Ci/Mol) inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 5 Versuchen.

5.7.2 Hemmung der Glutaminaufnahme durch Serin-Borat

Diese Versuchsreihe sollte klären, ob die Glutaminaufnahme durch Hemmung der y-Glutamyl-Transpeptidase beeinflußbar ist. Als Inkubationszeit wurden 10 Minuten gewählt, die längste Inkubationszeit mit vergleichsweise geringer Streuung. Bei längerer Inkubationszeit wäre zu befürchten, daß ein möglicherweise geringer Effekt durch die hier deutlich größere Streuung unentdeckt bliebe.

5.7.2.1 Versuchsdurchführung

In drei parallelen Versuchsreihen wurde Glutamin (0.1 mM) mit Serin-Borat, Serin und ohne Zusatz 10 Minuten lang inkubiert.
Die Ergebnisse sind in pMol / 10 Inseln +/- SEM als Mittelwerte aus 6 Versuchen aufgeführt.

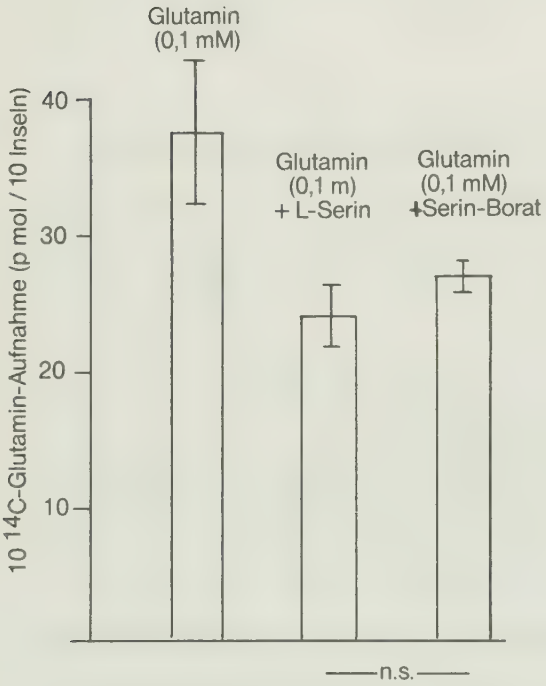
Tab.5.10

Aufnahme von Glutamin mit Serin bzw. Serin-Borat

Glutamin	37.0 pMol +/- 2.77
Glutamin + Serin	24.0 pMol +/- 2.25
Glutamin + Serin-Borat	27.2 pMol +/- 1.23

Die Werte sind in Abb.5.14 dargestellt

Abb. 5.14 Aufnahme von Glutamin mit Serin bzw.Serin-Borat in die Langerhanssche Insel der Ratte



10 Inseln wurden 10 Minuten lang in KR-Hepes-Puffer mit 0.1 mM 14-C Glutamin (spez.Akt. 280 Ci/Mol) zum einen mit 5 mM L-Serin, zum andern mit 5 mM L-Serin + 5 mM Natriumtetraborat inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 5 Versuchen

5.7.2.2 Schlußfolgerung

Serin vermindert mit und ohne Zusatz von Borat signifikant die Aufnahme von Glutamin in die Inselzellen.
Serin alleine zeigt aber dieselbe Hemmwirkung wie die Kombination mit Borat.

5.7.3 Einfluß von GSH und Diamid auf die Glutaminaufnahme

Durch die bisherigen Versuche ist noch nicht sicher widerlegt, daß Glutathion und der y-Glutamyl-Zyklus nicht doch eine Bedeutung für die Aminosäurenaufnahme der Langerhansschen Inseln besitzen.
Bisher wurde lediglich versucht, die Aufnahme durch Hemmung des Schlüsselenzyms zu vermindern.
Es wäre theoretisch denkbar, daß exogenes GSH in physiologischen Konzentrationen über den Meister-Zyklus einen Einfluß auf die Aufnahme von Aminosöuren besitzt.

In dieser Versuchsreihe wurde zum einen versucht, durch Zugabe von exogenem GSH die Aufnahme zu steigern, zum andern sollte der Einfluß von Diamid untersucht werden.

5.7.3.1 Versuchsdurchführung

Zunächst wurde über eine Dauer von 5 Minuten 0.1 mM Glutamin unter Zusatz von 0.1 mM GSH bzw. 0.1 mM Diamid inkubiert.

Die Konzentrationen wurden so gewählt, da GSH wie auch Diamid hier die maximalen Auswirkungen auf die Insulinsekretion gezeigt hatten.

5.7.3.2 Ergebnisse

Tab. 5.11

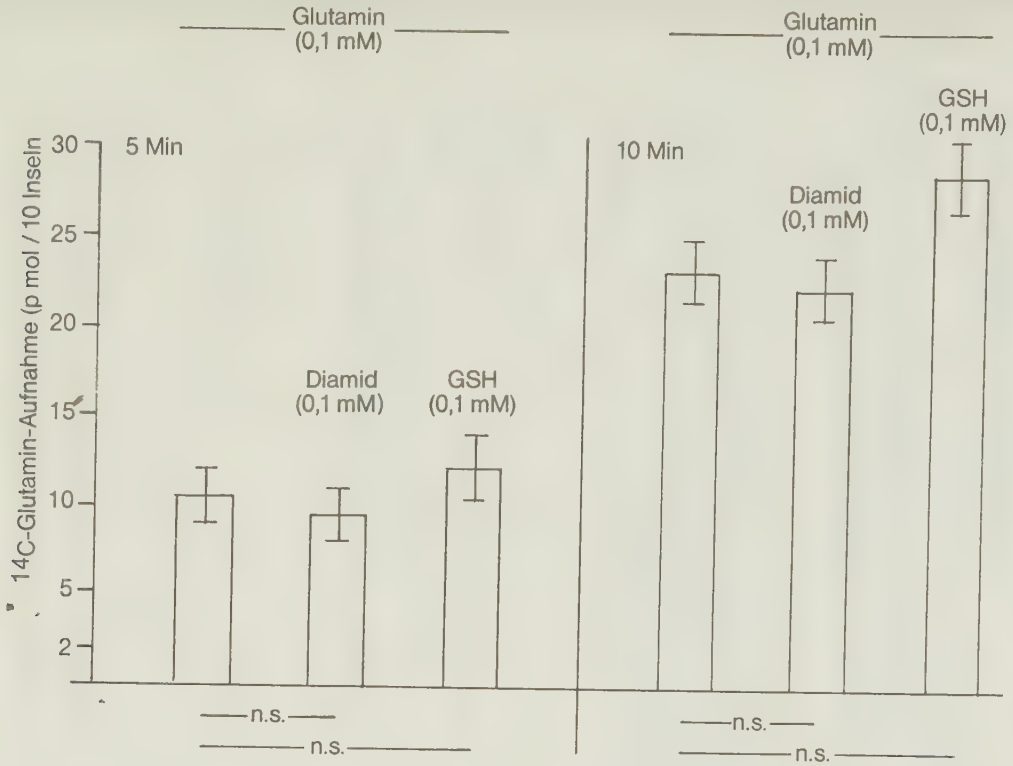
Aufnahme von Glutamin mit GSH bzw. Diamid

Glutamin	10.7 +/- 1.24
Glutamin + GSH	11.9 +/- 1.70
Glutamin + Diamid	9.5 +/- 1.01

10 Inseln wurden für 5 Minuten in KRB-Hepes Puffer mit 0.1 mM 14-C Glutamin inkubiert. Zugesetzt wurde wahlweise 0.1 mM GSH bzw. 0.1 mM Diamid. Die Aufnahmen in pMol/10 Inseln sind angegeben als Mittelwerte +/-SEM aus 6 Versuchen.
Darstellung Abb.5.15
Sowohl der Zusatz von GSH als auch von Diamid konnte die Aufnahme nicht signifikant beeinflussen.

5.7.3.3 Verlängerung der Inkubationszeit

Obwohl weder GSH noch Diamid eine signifikante Änderung bei 5 Minuten bewirkt hatten, zeigten die Ergebnisse dennoch einen leichten Trend in die erwartete Richtung (Hemmung durch Diamid, Steigerung durch GSH).



10 Inseln wurden 5 und 10 Minuten in KR-Hepes Puffer mit 14-C Glutamin (0.1 mM, spez.Akt. 280 Ci/Mol) unter Zusatz von 0.1 mM GSH bzw. 0.1 mM Diamid inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 5 Versuchen.

Aus diesem Grund wurde unter denselben Bedingungenwie im vorangegangenen Versuch nur mit auf 10 Minuten verlängerter Dauer inkubiert.

5.7.3.4 Ergebnisse

Tab.5.12

Aufnahme von Glutamin mit GSH bzw. Diamid

Glutamin	22.9 +/- 2.64
Glutamin + GSH	28.1 +/- 2.26
Glutamin + Diamid	22.0 +/- 1.50

10 Inseln wurden 10 für 10 Minuten in KRB-Hepes Puffer mit 0.1 mM Glutamin inkubiert. Wahlweise wurde 0.1 mM GSH oder 0.1 mM Glutamin zugesetzt. Die Werte, angegeben in pMol/10 Inseln sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen; Darstellung Abb. 5.15

Es zeigt sich erneut eine Steigerung der Aufnahme des Glutamins durch exogenes GSH. Die Zunahme ist allerdings nicht signifikant. Diamid zeigt keine erkennbare Wirkung.

5.7.3.5 Vorinkubation mit 0.1 mM Diamid

Diamid senkt den intrazellulären Gehalt an GSH. Besonders bei kurzen Inkubationszeiten ist es sinnvoll, vor Beginn der Hauptinkubation eine Vorinkubation mit Diamidzusatz durchzuführen.

Da bei den vorausgegangenen Versuchen ein leichter (nicht signifikanter Abfall der Aufnahme zu beobachten war, wurde hier versucht, durch eine solche Vorinkubation einen deutlicheren Effekt zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde eine zehnminütige Vorinkubation mit 0.1 mM Diamid der Hauptinkubation mit Glutamin und Diamid vorausgeschickt.

5.7.3.6 Ergebnisse

Tab 5.13

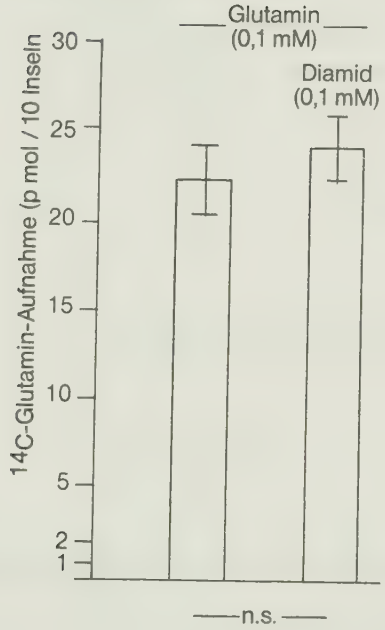
Aufnahme von Glutamin nach Vorinkubation mit Diamid

Glutamin	23.0 +/- 2.6
Glutamin + Diamid	24.3 +/- 1.3

10 Inseln wurden 10 Minuten in KRB-Hepes Puffer mit 0.1 mM Diamid vorinkubiert und anschließend unter Zusatz von 0.1 mM Glutamin hauptinkubiert. Als Kontrolle dient eine zehnminütige Inkubation mit 0.1 mM Glutamin, die Angaben erfolgen in pMol/10 Inseln und sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen. Darstellung Abb. 5.16

Es ergibt sich keine signifikante Differenz zur Kontrolle. Auch nach Vorinkubation kann Diamid folglich die Glutaminaufnahme nicht beeinflussen.

Abb. 5.16 Aufnahme von Glutamin nach Vorbehandlung mit Diamid



10 Inseln wurden in KR-Hepes-Puffer unter Zusatz von 0.1 mM Diamid 10 Minuten vorinkubiert. Nach Zusatz von 14-C Glutamin (0.1 mM, spez.Akt. 280 Ci/Mol) wurde 10 Minuten weiterinkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 5 Versuchen

5.7.3.7 Inkubation ohne Albuminzusatz

Der Zusatz von Rinderserumalbumin verbessert die Vitalität der Langerhansschen Inseln, insbesondere was die Insulinsekretion und die Ionenflüsse betrifft.

Da aber auch Störungen durch Albuminzusatz - unspezifische Bindungen zu Beispiel - denkbar sind und Albumin für die Aminosäurenaufnahme nicht zwingend notwendig ist (vergleiche methodischer Teil) wurde zu Kontrollzwecken der Aufnahmeversuch mit und ohne GSH in albuminfreiem Medium widerholt.

5.7.3.8 Ergebnisse

Tab. 5.14

Glutaminaufnahme in albuminfreiem Medium

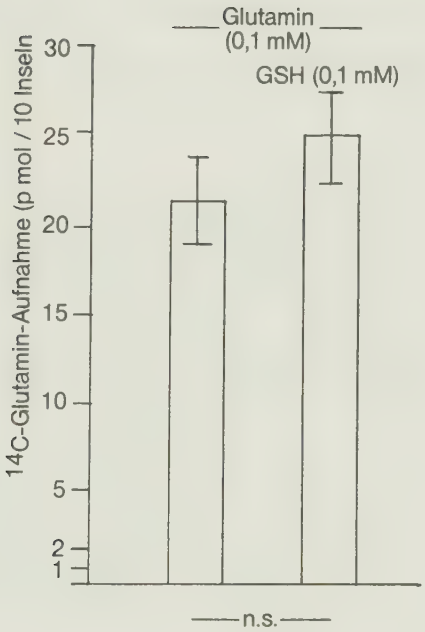
Glutamin	20.1 +/- 2.25
Glutamin + GSH	25.7 +/- 2.18

10 Inseln wurden mit 0.1 mM Glutamin in albuminfreiem KRB-Hepes Puffer 10 Minuten lang mit und ohne Zusatz von 0.1 mM GSH inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM in pMol /10 Inseln aus 5 Versuchen.

Auch in albuminfreiem Medium konnte kein signifikanter Anstieg der Glutaminaufnahme in die Inselzellen festgestellt werden.

Darstellung siehe Abb. 5.17

Abb. 5.17 Aufnahme von Glutamin mit GSH in albuminfreiem Medium



10 Inseln wurden in albuminfreiem KR-Hepes Puffer mit 0.1 mM 14-C Glutamin (spez.Akt.280 Ci/Mol) unter Zusatz von 0.1 mM GSH 10 Minuten lang inkubiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte +/- SEM aus 5 Versuchen.

5.7.3.9 Aufnahme von Glutamin in geringer Konzentration

Bei den Versuchen zur Entwicklung der Methode hatte sich gezeigt, daß das Aufnahmesystem bem Einsatzeit kleiner Konzentrationen mit hoher spezifischer Radioaktivität besonders enmpfindlich auf äußere Einflüsse reagiert.

Aus diesem Grund wurden nun noch Aufnahmeversuche mit 1 uM Glutamin in nahezu unverdünnt radioaktiver Form durchgeführt.

5.7.3.10 Versuchsdurchführung

Wie für jede neue Substanz oder Konzentration wurde eine Aufnahmekurve - hier von 1 bis 25 Minuten - für 1 uM Glutamin erstellt.

Parallel dazu wurde dieselbe Kurve nur mit Zusatz von 0.1 mM GSH aufgenommen.

5.7.3.11 Ergebnisse

Tab. 5.15

Aufnahme Glutamin 1 uM

Minuten	fMol	+/-	SEM
1	85.2	+/-	14.6
3	214.0	+/-	21.0
5	312.0	+/-	22.3
10	705.9	+/-	95
15	719.9	+/-	75.8
25	1176.8	+/-	106.0

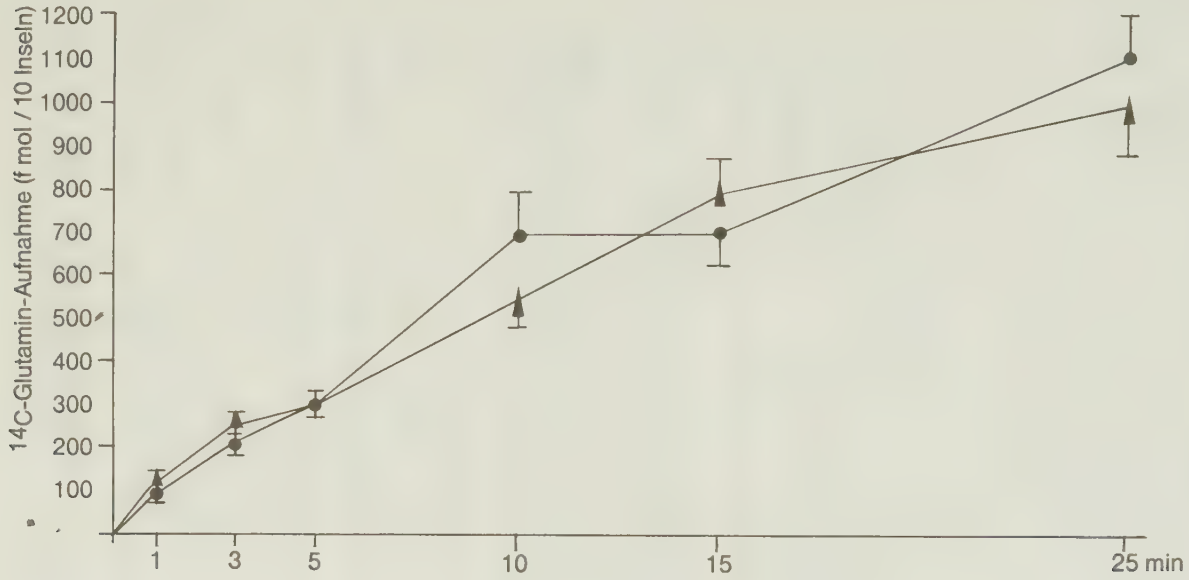
Aufnahme Glutamin 1 uM + 0.1 mM GSH

Minuten	fMol	+/-	SEM
1	101.8	+/-	7.5
3	252.3	+/-	20.1
5	299.4	+/-	32.9
10	565.6	+/-	64.7
15	805.7	+/-	64.7
25	1049.7	+/-	113.6

10 Inseln wurden in KRB-Hepes Puffer unter Zusatz von 1 yM 14-C Glutamin über 10 Minuten mit und ohne Zusatz von 0.1 mM GSH inkubiert. Die Aufnahmen sind angegeben in fMol/10 Inseln und sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen. Darstellung Abb.5.18

Die Aufnahme zeigt einen annähernd linearen Verlauf zwischen 0 und 25 Minuten.
Bei keiner Inkubationszeit findet sich eine signifikante Änderung der Aufnahme durch GSH-Zusatz.

Abb. 5.18 Aufnahme von Glutamin mit und ohne GSH



10 Inseln wurden zwischen 1 und 25 Minuten in KR-Hepes Puffer mit 1 yM 14-C Glutamin (spez.Akt. 280 Ci/Mol) mit und ohne Zusatz von 0.1 mM GSH inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM aus 6 Versuchen.

6 D I S K U S S I O N

6.1 LEUCIN

Frühere Aufnahmeversuche an Langerhansschen Inseln zeigen, daß Leucin in Konzentrationen zwischen 1 und 25 mM sich nicht nur über den Sucrose-Raum verteilt, sondern in die Inselzellen aufgenommen wird (Hellman et al., 1971a).
Hierbei wurden halbmaximale Aufnahmen nach etwa 4 Minuten und ein mit einer Sättigung vergleichbares Plateau nach etwa 15 bis 20 Minuten erreicht. Der sich daran anschließende leichte Anstieg wurde mit der einsetzenden Verstoffwechselung begründet.
Weiter wurde eine Linearität zwischen eingesetzter Konzentration und aufgenommenem Leucin im Bereich zwischen 1 und 25 mM beschrieben.

Versuche in unserem Labor mit Konzentrationen von 1 und 10 yM zeigen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf (Pfäffle, 1984). Allerdings führte eine Erhöhung der Leucin - Konzentration im Inkubationsmedium von 1 auf 10 yM nur zu einer fünffach höheren Aufnahme an 14-C Leucin in die Insel.

Da nicht auszuschließen war, daß sich hier bereits eine Aufnahme-Sättigung im mikromolaren Bereich abzeichnet, wurde in dieser Arbeit zunächst mit einer Konzentration von 100 yM gearbeitet, was obendrein in etwa der physiologischen Konzentration (112 yM) entspricht.
Von der Aufnahmekinetik her gibt es keinen Unterschied zu den geringeren Konzentrationen und auch hier führt eine zehnfache

Konzentrationserhöhung im Medium zu einer etwa fünffach höheren Aufnahme, wodurch eine Sättigung im mikromolaren Bereich bereits ausgeschlossen werden kann.

Da eine Beeinflussung der Insulinsekretion erst in einem Konzentrationsbereich von 10 mM zu erwarten ist (Ashcroft, 1973) wurde zusätzlich die Aufnahme von Leucin in Konzentrationen von 1 und 10 mM untersucht.
Während die Steigerung von 0.1 auf 1 mM nochmals eine etwa fünffach höhere Aufnahme mit sich bringt, erhöht die nochmalige Steigerung der Leucin-Konzentration im Inkubationsmedium auf 10 mM die Aufnahme an 14-C markiertem Leucin nur noch um das etwa 1 1/2 fache.

Trotzdem zeigte Leucin in den anschließenden Versuchen zur Insulinsekretion in einer Konzentration von 1 mM keine Beeinflussung der Insulinfreisetzung, während mit 10 mM die bekannte, glucoseunabhängige Simumulation der Insulinsekretion beobachtet werden konnte.
Die nur noch gering gesteigerte Aufnahme von Leucin im Bereich zwischen 1 und 10 mM könnte ein Hinweis auf einen möglichen extrazellulären Effekt für die Insulinsekretion sein.
Dagegen spricht allerdings die Tatsache, daß die Verstoffwechselung von Leucin im Bereich von 1 bis 20 mM noch annähernd proportional zunimmt (Malaisse et al., 1980).
Eine Erklärung für den Widerspruch von nur noch gering gesteigerter Aufnahme von Leucin auf der einen und proportional zu der

Konzentration von Leucin gesteigertem Stoffwechsel auf der anderen Seite ist möglicherweise in der Methodik der Aufnahmemessung zu suchen. Gemessen wird nur die in Form von markiertem Leucin in die Insel aufgenommene Radioaktivität. Bei entsprechend hoher Stoffwechselleistung und einer Inkubationszeit von 60 Minuten hat möglicherweise ein erheblicher Teil der aufgenommenen Radioaktivität die Inselzelle wieder verlassen und täuscht somit eine geringere Aufnahme vor als tatsächlich stattgefunden hat.

6.2 Aufnahmestudien mit Thiolen

6.2.1 Glutathion

Um den Mechanismus der Beeinflussung der Insulinsekretion durch Thiole aufklären zu können, galt es in diesem Zusammenhang zu klären, ob exogen zugeführtes, reduziertes Glutathion möglicherweise von den Zellen der Langerhansschen Inseln aufgenommen wird und somit zum intrazellulären GSH-Pool beiträgt.

An verschiedenen Geweben wurden bereits Untersuchungen zur Membrangängigkeit von Glutathion durchgeführt.

Die Perfusion der Leber unter Zusatz von radioaktiv markiertem GSH bzw. GSSG führt zu keiner Abnahme der Radioaktivität im Medium was darauf schließen läßt, daß keine markierte Substanz von den Leberzellen aufgenommen wird. Nach Waschen sinkt die Aktivität auf 0 ab und steigt auch nach Schließen des Systems nicht mehr an. Ein parallel dazu mit radioaktiv markierter, nicht membrangängiger Sucrose durchgeführtes Experiment zeigt dasselbe Ergebnis (Hahn et al., 1978).

Versuche mit "inside-out-Vesikeln" zeigen, daß GSSG in Abhängigkeit von der Konzentration und in Anwesenheit von ATP durch die Membran von Erythrocyten gehen kann. Da ATP benötigt wird, handelt es sich wohl um einen aktiven Transport. Bei Inkubation mit reduziertem Glutathion konnte dagegen keine Aufnahme beobachtet werden (Kodo et al., 1980).

Die Perfusion der Kaninchen-Cornea mit GSH- bzw- GSSH haltigem Medium führt zu einer Erhöhung des Glutathion-Levels im Gewebe.

Vermutlich durchdringt aber auch hier nur die oxidierte Form die Membran, da bei den Perfusionen mit GSSG der Gesamtglutathionlevel am höchsten liegt und nach 5 Stunden ca. 90 % des eingesetzten GSH oxidiert sind (Whickehart u. Edelhauser, 1978).

Anders sieht es bei Betrachtung der Niere aus. y-Glutamyl-Peptide sind generell in der Lage, die Nierenzellen in aktiver Form zu betreten (Orlowski u. Wilk, 1976), was möglicherweise in einem Zusammenhang mit der an der Niere besonders hohen Aktivität der y-Glutamyl-Transpeptidase steht.

An isolierten Nierenzellen mit einem auf 30% des ursprünglichen Wertes herabgesetzten GSH-Gehalt führt Inkubation mit GSH (1mM), GSSG (0.5 mM) oder mit GSH-konstituierenden Aminosäuren zu einem schnellen Ausgleich des GSH-Defizits. Neben der Aufnahme von Spaltprodukten findet auch eine direkte Aufnahme von GSH statt. Diese direkte Aufnahme spielt allerdings nur unter extremen Bedinugen, wie etwa einer 300fach höheren als physiologischen Konzentration, eine Rolle (Ormstad et al., 1980).
Ebenfalls an Nierengewebe konnten auch Lash und Jones (1983) eine GSH- Aufnahme zeigen

Auch Meister (1980) schließt nicht aus, daß GSH ebenso wie es aus der Zelle harausgeht umgekehrt auch hineingehen kann. Insbesondere Zellen, die nur über eine geringe Transpeptidaseaktivität verfügen, kämen dafür in Frage.

Daß intrazelluläres Glutathion nach außen wandert gilt heute als gesichert und ist an der Niere, (Owen et al., 1979 , Meister u. Griffith, 1980), an der perfundierten Leber (Bartoli u. Sies, 1978), an isolierten Hepatocyten (Thor et al., 1979, an Erythrocyten (Srivastava u. Beutler, 1969) und an kultivierten Fibroblasten (Bannai u. Tsukeda, 1979) gezeigt worden.

Das freigesetzte Glutathion dient der an der Außenseite der Membran lokalisierten y-Glutamyl-Transpeptidase als Substrat (Griffith et al., 1978 , Meister u. Anderson, 1983). Der Ausstrom von Glutathion aus der Zelle ist aber nicht an y-Glutamyl-Transpeptidase-Aktivität gebunden (Griffith et al., 1979). Vielmehr verwerten Zellen mit einer hohen Y-GTP-Aktivität das ausgeströmte GSH schnell, während solche mit geringer Aktivität es im Medium belassen (Griffith et al., 1979).

Dieser zunächst überraschende Weg wird verständlich, betrachtet man die Konzentrationsverhältnisse. Während intrazellulär GSH in einer Konzentration von 0.5 bis 10 mM vorliegt ist es extrazellulär nur im mikromolaren Bereich zu finden.

Auch an der Langerhanschen Insel finden wir dieses Konzentrationsverhältnis und auch y-Glutamyl-Transpeptidase-Aktivität ist an der Insel nachgewiesen worden (Anjaneyulu et al., 1981).

Die Aufnahme von reduziertem Glutathion an Langerhansschen Inseln ist zuvor noch nicht untersucht worden.

In den bisherigen Arbeiten war die Frage nach der Lokalisation der Wirkung von Glutathion auf die Insulinsekretion noch offen

geblieben. Aufgrund der hohen intrazellulären GSH-Konzentration und der im Vergleich dazu geringen GSH-Konzentration im Medium war man zwar davon ausgegangen, daß nicht die Aufnahme von Glutathion für den potenzierenden Effekt auf die Insulinsekretion verantwortlich ist, sondern daß ein vom intrazellulären GSH-Pool unabhängiger, wahrscheinlich extrazellulär lokalisierter, Mechanismus hierfür in Frage kommt (Hehl, 1984).

Um das zu beweisen, wurden in dieser Arbeit Glutathion und Sucrose in einer Konzentration von 0.1 mM miteinander verglichen. Diese Konzentration wurde gewählt, da hier der maximale Effekt auf die Insulinsekretion feststellbar ist. Sucrose ist bekannterweise nicht membrangängig und verteilt sich rasch über den sogenannten Extrazellulärraum (Hellmannet al., 1971). Nach 4 Minuten Inkubation mit 3-H markierter Sucrose erfolgte in diesen Versuchen bereits kein Anstieg in der gemessenen Aktivität mehr, woraus zu schließen ist, daß die Verteilung abgeschlossen ist (Abb. 5.6).

Die selbe Kinetik ist bei einer Inkubation mit 3-H-GSH zu beobachten. Bis zur dritten Minute erfolgt ein Anstieg in der gemessenen Gesamtaktivität, der mit der Verteilung über den Extrazellulärraum zu erklären ist.

Nach 3 Minuten ist dann bis zum Ende der Inkubation nach 10 Minuten kein Anstieg in der Gesamtaktivität mehr zu messen und auch die absolute Höhe dieser Aktivität entspricht umgerechnet den mit Sucrose gemessenen Werten.

Die Inkubationszeit wurde so kurz gewählt, da GSH einer raschen Oxidation unterliegt und der potenzierende Effekt auf die Insulinsekretion ja bereits nach 10 Minuten messbar war (Ammon et al., 1984).
Auch ein Kontrollversuch mit geringerer Konzentration (1 yM) und hoher spezifischer Aktivität zeigt dasselbe Ergebnis (Abb.)

Eine Aufnahme von Glutathion kann also für die ersten 10 Minuten einer Inkubation mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Insbesondere erfolgt keine Aufnahme, die in nennenswerter Weise zum intrazellulären GSH-Pool beitragen kann. Diese Aussage gilt auch bedingt für die Einzelkomponenten des Glutathions, denn wäre das GSH durch die y-Glutamyl-Transpeptidase gespalten worden, so wäre Cysteinylglycin freigesetzt und in die Insel aufgenommen worden und hätte zu einer Aktivitätszunahme geführt.

Dies beweist, daß Glutathion seine Wirkung auf die Insulinsekretion nicht über eine Aufnahme in die Insel und daraus resultieremde Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehalts und auch nicht über einen anderen intrazellulären Mechanismus auslöst, sonder daß es sich vielmehr um einen extrazellulär lokalisierten Effekt handelt.

6.2.2 N - Acetyl - Cystein

N-Acetyl-Cystein wirkt in ähnlicher Konzentration wie GSH auf die Insulinsekretion und auch hier war die Frage nach der Lokalisation dieser Wirkung zu beantworten.

In der Leberzelle kann NAC den intrazellulären GSH-Spiegel anheben (Williamson et al., 1982). Theoretisch könnte folglich nach intrazellulärer Deacetylierung zusätzliches Cystein für die GSH-Synthese zur Verfügung stehen. Denkbar wäre auch eine extrazelluläre Deacetylierung und anschließende Aufnahme. Nach den Untersuchungen von Williamson (1982) ist es allerdings fraglich, ob die Substanz schnell genug von den Zellen der Langerhansschen Inseln aufgenommen werden kann, um intrazellulär an der Potenzierung der Insulinsekretion beteiligt zu sein.

Auch für N-Acetyl-Cystein wurde eine Konzentration von 0.1 mM gewählt, da sich hier bereits ein maximaler Effekt auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion gezeigt hat (Hehl, 1984) Die für N-Acetyl-Cystein gemessene Aufnahmekurve zeigt wieder den typischen Verlauf, wie er auch mit Sucrose und GSH beobachtet werden konnte mit dem einen Unterschied, daß die Verteilung über den Extrazellulärraum hier bereits nach 1 Minute erfolgt war. Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied zur Sucrose messbar.
Eventuell aufgenommene geringe Mengen an NAC, die durch diese Versuchsanordnung nicht erfassbar wären, sind mit Sicherheit

nicht ausreichend, um intrazellulär einen für die Insulinsekretion entscheidenden Beitrag zur Glutathionbiosynthese zu leisten.

Auch ein anderer intrazellulärer Mechanismus ist nach diesen Ergebnissen sehr unwahrscheinlich. Es deutet vielmehr alles darauf hin, daß N-Acetyl-Cystein, genau wie Glutathion, das ja auch im selben Konzentrationsbereich die Insulinsekretion potenziert, über einen extrazellulär lokalisierten Mechanismus wirkt.

6.2.3 Cystein

Cystein unterscheidet sich in seiner Wirkung auf die Insulinsekretion von den beiden bisher untersuchten Substanzen. Während GSH und N-Acetyl-Cystein bereits bei einer Konzentration von 0.1 mM ihren maximalen Effekt auf die Insulinfreisetzung zeigen, muß Cystein in Konzentrationen zwischen 3 bis 7 mM eingesetzt werden. Auch war von vorne herein anzunehmen, daß Cystein in die Insel aufgenommen wird, da in Untersuchungen über die Aufnahme von Cystein an isolierten Hepatocyten nach 15 bzw. 20 Minuten eine deutliche Aufnahme gemessen wurden. (Reed u. Orrenius, 1977 , Beatty u. Reed, 1981). Gleichzeitig wurde in beiden Fällen ein Zusammenhang zwischen dem zugeführten Cystein und der GSH-Synthese gefunden.

Cystein wird rasch in Abhängigkeit von der Zeit in die Langerhanssche Insel aufgenommen (Abb. 5.9). Die halbmaximale Aufnahme wird bereits nach etwa 3 Minuten erreicht, eine Sättigung ist nach etwa 20 bis 25 Minuten zu beobachten. Die Aufnahmekinetik ähnelt sehr stark den mit Leucin gemessenen Kurven und auch die Betrachtung der absoluten Aufnahmen von Cystein und Leucin im Bereich der jeweiligen Sättigung zeigt keinen signifikanten Unterschied.

Die Daten lassen folgliche den Schluß zu, daß Cystein sehr schnell in die Inselzelle permeiert und dort sehr wohl, sei es für einen intrazellulären Mechanismus, sei es für die Glutathionbiosynthese, zur Verfügung steht.

6.2.4 Lokalisation der Thiolwirkung

Nach den vorangegangenen Aufnahmeversuchen steht fest, daß GSH und NAC ihre Wirkung auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion nicht über einen intrazellulär lokalisierten Mechnismus entfalten können.

Schon in früheren Untersuchungen (Ammon et al., 1980) war auf die Bedeutung der Thiolgruppen in der Zellmembran der B-Zelle für die insulinfreisetzende Wirkung der Glucose hingewiesen worden. Diese Membran-Protein-Sulfhydrylgruppen werden durch das intrazelluläre Glutathionsystem, das seinerseits über den PPS und NADPH beeinflußt wird, im reduzierten Zustand gehalten. Eine Möglichkeit für intrazelluläres GSH mit den Membran-Thiolen in

Kontakt zu kommen wäre der an anderen Geweben gefundene GSH-Efflux aus der Zelle. Die im Vergleich zur Niere sehr viel geringere Aktivität der y-Glutamyl-Transpeptidase (Anjaneyulu, 1981) reicht wie an fast allen Geweben kaum dazu aus, das gesamte GSH über den y-Glutamyl-Zyklus zu verstoffwechseln. Damit stünde das Glutathion auch für andere biologische Prozesse an bzw. in der Zellmembran zur Verfügung.

Eine wichtige Aufgabe wäre der Schutz der Membran dadurch, daß essentielle SH-Gruppen im reduzierten Zustand gehalten werden (Meister, 1983).

Wäre dies auch an der Insel der Fall, so könnte eine membranständige Dehydrogenase GSH als Substrat zur Reduktion von Membrandisulfiden verwenden.

Ein möglicherweise diesem Zweck dienendes Enzym ist an der B-Zellmembran der Ratte immunohistochemisch nachgewiesen worden (Dorn et al., 1978). Es katalysiert Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen und konnte mit unterschiedlicher Funktion an vielen Zellen nachgewiesen werden (Morin et al., 1983)

Selbstverständlich wäre auch exogen zugesetztes GSH Substrat für dieses Enzym und könnte über diesen Weg zur Reduktion der für die durch Glucose induzierte Insulinsekretion wichtigen Disulfidbrücken der Zellmembran führen.

In der Spezifität eines solchen Enzyms wäre auch die Erklärung zu finden, weshalb Thiole, die in der Lage sind, die Insulinsekretion zu beeinflussen, über eine Cystein-Komponente verfügen müssen (Ammon u.Mark, 1985)

Der Wirkort für exogen zugeführtes Cystein bleibt weiter unklar. Obwohl es aufgrund der raschen Aufnahme wahrscheinlich ist, daß Cystein intrazellulär und dort möglicherweise über die GSH-Biosynthese agiert, kann eine extrazelluläre Wirkung, vergleichbar mit GSH und NAC, nicht ausgeschlossen werden. Da zur Beeinflussung der Insulinsekretion durch Cystein sehr viel höhere Konzentrationen im Medium notwendig sind, müßte in diesem Fall die Affinität zu dem oben postulierten System geringer sein.

Eine schematische Darstellung (Abb.6.1) verdeutlicht nochmals die oben beschriebenen Prozesse und Spekulationen.

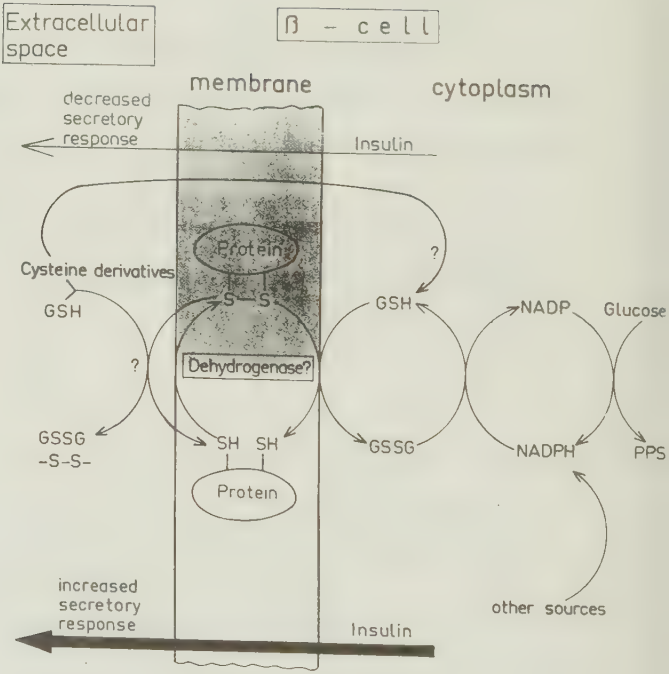
Abb. 6.1

Thiol dependent stimulators

- Glucose
- Glyceraldehyde
- Tolbutamide
- p-chloromercuribenzoate
- Leucine

Non thiol dependent stimulators

- Arginine
- Ionophore A 23187
- Glibenclamide
- Theophylline
- db-cAMP
- Isoproterenol



6.3 Aufnahme von Aminosäuren über den y-Glutamyl-Zyklus

Aufnahmen von y-Glutamyl-Aminosäuren wurden von Meister bereits mehrfach beschrieben (1976, 1981).
Nicht nur an der Niere, sondern auch an Leber und exokrinem Pankreas wurden solche Aufnahmen gefunden. Daß hier tatsächlich y-Glutamyl-Aminosäuren transportiert werden geht aus den Untersuchungen von Griffith et al. (1979) hervor. So ist die Aufnahme von y-Glutamyl-Methionin an der Niere deulich höher als die von Methionin und die Aufnahme des y-Glutamyl-Methionins war durch andere y-Glutamyl-Aminosäuren, nicht aber durch freie Aminosäuren hemmbar. Dies ist insofern ein Beweis, als daß für die Aufnahmen von Aminosäuren generell gilt, daß solche Aminosäuren, die über denselben Transportmechanismus durch die Membran transportiert werden, sich in der Aufnahme kompetitiv zueinander verhalten, sich also gegenseitig in der Aufnahme hemmen (Jungermann und Möhler, 1980).

Aufnahme von y-Glutamyl-Aminosäuren und y-Glutamyl-Zyklus stehen in engem Zusammenhang. Wichtigstes Schlüsselenzym in diesem Kreislauf ist die y-Glutamyl-Transpeptidase. Dieses Enzym, das an der Niere die höchste Aktivität zeigt, wurde an diesem Gewebe an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert (Mc Intyre, 1982). Aber nicht nur an der Niere, sondern auch unter anderem an Dünndarm, Nebenhoden und Samenblase (Meister, 1976) an

Lymphoidzellen (Tate, 1980), sowie an Pankreasinseln (Anjanejulu, 1981) wurde y-Glutamyl-Transpeptidaseaktivität gefunden.

Substrat der y-Glutamyl-Transpeptidase ist Glutathion. Neben extrazellulärem (Plasma-) GSH ist mit Sicherheit auch intrazelluläres GSH an dem Zyklus beteiligt. Durch einen wahrscheinlich aktiven Transportprozess (Kondo, 1981) kommt intrazelluläres Glutathion mit der an der Außenseite der Membran befindlichen y-Glutamyl-Transpeptidase in Kontakt (Hahn et al., 1978). Durch dieses Enzym kommt es zunächst zur Aufspaltung des GSH in Cysteinylglycin und einen y-Glutamylrest, der seinerseits auf einen Akzeptor übertragen wird.
Als Akzeptoren dienen unter anderem auch Aminosäuren die, an den y-Glutamylrest gebunden, in die Zelle wandern (Meister, 1983). Nach der durch y-Glutamyl-Cyclotransferase vermittelten Abspaltung des y-Glutamyl-Anteils, der wiederum in die GSH-Synthese eingeht, liegt intrazellulär die freie Aminosäure vor.

Cystin und Glutamin sind die bevorzugten Aminosäuren für dieses Transportsystem, aber es kommen auch andere, wie zum Beispiel Valin oder Histidin in Frage (Vina et al., 1980).

Obwohl y-Glutamyl-Transpeptidaseaktivität an der Inselzelle nachgewiesen wurde, (Anjanejulu et al., 1981) wurde bis jetzt nicht untersucht, ob auch der y-Glutamyl-Zyklus an der Insel funktioniert und ob Aminosäuren über diesen Weg aufgenommen werden können.

Exogenes GSH könnte theoretisch als Substrat für die y-Glutamyl-Transpeptidase dienen und somit die Aufnahme von y-Glutamyl-Aminosäuren steigern.

6.3.1 Beeinflussung der Glutaminaufnahme durch GSH und Diamid

Versuche, die Leucinaufnahme in die Langerhanssche Insel durch exogenes GSH bzw. durch Oxidation des intrazellulären Glutathions zu beeinflussen waren fehlgeschlagen (Pfäffle, 1984). Leucin gehört allerdings auch nicht zu den mutmaßlichen Aminosäuren, die über den y-Glutamyl-Zyklus aufgenommen werden (Tate u.Meister, 1974).
So wurde für die Versuche in dieser Arbeit Glutamin verwendet und tatsächlich führte der Zusatz von 0.1 mM GSH zu einer leichten Zunahme der Glutaminaufnahme in die Langerhanssche Insel bei einer Inkubationszeit von 5 bzw. 10 Minuten. Die Zunahme bleibt allerdings in beiden Fällen unter der Signifikanzgrenze.

Um diesen Trend möglicherweise zu verstärken, wurde in einer zweiten Versuchsreihe unter denselben Bedingungen in albuminfreiem Medium gearbeitet. Durch diese Maßnahme sollten denkbare Störeinflüsse, wie z.B. unspezifische Bindungen, ausgeschlossen werden. Aber auch durch diese Maßnahme war nur eine leichte, nicht signifikante Steigerung zu erreichen (Abb.5.16).

Nicht ausgeschlossen werden kann, daß möglicherweise durch eine Erhöhung der GSH-Konzentration im Medium ein deutlicherer Effekt zu zeigen gewesen wäre. In dieser Arbeit sollten aber bewußt Konzentrationen im physiologischen Bereich verwendet werden, um möglicherweise eine Funktion des Blut-GSH zeigen zu können.

Da vor allem intrazelluläres GSH als Substrat der y-Glutamyl-Transpeptidase fungiert wurde versucht, durch Oxidation von intrazellulärem GSH das Substratangebot und damit auch die Aufnahme zu vermindern.
Zu diesem Zweck wurde dem Medium Diamid in einer Konzentzration von 0.1 mM zugesetzt. Diese Konzentration führt zu einer Abnahne des intrazellulären GSH von 85 auf 45 pMol/10 Inseln (Ammon et al., 1984), ohne das intrazelluläre ATP herabzusetzen (Ammon et al., 1982)
Aufnahme von Glutamin in die Inselzellen konnte durch diese Behandlung nicht nicht beeinflußt werden.

Um den GSH-Abfall sicherzustellen wurden die Inseln in einer zweiten Versuchsreihe zusätzlich 10 Minuten mit 0.1 mM Diamid vorinkubiert. Auch diese Maßnahme führte zu keiner Hemmung der Glutaminaufnahme (Abb.5.15)
Höhere Diamid-Konzentrationen im Medium konnten nicht verwendet werden, da schon bei einer Konzentration von 0.25 mM ein deutlicher Abfall des intrazellulären ATP zu beobachten ist (Ammon et al, 1982)

Trotz dieser Ergebnisse kann eine Bedeutung von extra- und intrazellulärem GSH für den Aminosäurentransport der Inselzelle nicht ausgeschlossen werden. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß die y-Glutamyl-Transpeptidase durch aus dem Zellinneren ausgeströmtes Glutathion bereits gesättigt ist und hier durch exogenen Zusatz von GSH keine weitere Steigerung mehr möglich ist. Umgekehrt besteht möglicherweise ein Überangebot an intrazellulärem GSH, so daß auch nach einer Herabsetzung des intrazellulären GSH-Spiegels durch Diamid noch ausreichend Substrat für die y-Glutamyl-Transpeptidase zur Verfügung steht.

6.3.2 Hemmung der y-Glutamyl-Transpeptidase

Die y-Glutamyl-Transpeptidase gilt in der Literatur als das einzig bekannte Enzym, das in der Lage ist, Glutathion zu spalten (Orlowski u. Wilk, 1976).
Vor allem in Geweben mit Sekretions- oder Resorptionsaufgaben wie z.B. Niere, Darm, Schilddrüse und Pankreas ist Transpetidaseaktivität zu finden (Meister et al, 1976). Die mit Abstand höchste Aktivität zeigt sich an der Niere, gefolgt vom exokrinen Pankreas, Samenblase und Nebenhoden. Nur noch geringe Aktivität ist an der Leber messbar.

Die y-Glutamyl-Transpeptidase läßt sich durch ein Gemisch aus L-Serin und Natriumtetraborat hemmen (Revel u. Bahl, 1959). In Gegenwart von 5 mM Serin und 5 mM Borat geht die Aktivität des Enzyms auf 2% der ursprünglichen Größe zurück. Weder Serin, noch Borat zeigen, jedes für sich, irgendeine Wirkung auf die y-Glutamyl-Transpeptidase (Dethmers u. Meister, 1981).
Serin und Borat bilden einen Komplex mit strukturellen Merkmalen, wie sie auch beim Substrat des Enzyms zu finden sind. Durch diese Bindung, die auch Schutz des Enzyms vor Zerstörung bedeuten kann (Tate u. Meister, 1974) kommt es zur Inaktivierung.

Die Hemmung erfolgt kompetitiv und ist voll reversibel (Tate u. Meister, 1978).

Die hemmende Wirkung von Serin-Borat auf das Enzym konnte auch in vivo gezeigt werden. So kann die Kombination den durch die Gabe hoher Konzentrationen von Methionin hervorgerufenen Abfall des intrazellulären GSH und den damit verbundenen Anstieg des 5-Oxoprolins verhindern (Owen et al., 1978). Auch der durch Glycylglycin hervorgerufene GSH-Abfall kann durch Serin-Borat unterbunden werden (Griffith et al., 1978)

6.3.2.1 Einfluß von Serin-Borat auf die Cysteinaufnahme

Obwohl Cystein nicht zu den Aminosäuren zählt, die bevorzugt über der y-Glutamyl-Zyklus aufgenommen werden, wurde versucht, durch Hemmung des Schlüsselenzyms die Aufnahme zu vermindern.

Überraschenderweise führte die Hemmung der y-Glutamyl-Transpeptidase durch Serin-Borat zu einer verminderten Aufnahme von Cystein in die Langerhanssche Insel verglichen mit Aufnahmewerten ohne Zusatz (Abb.5.10). Nach 1, 3, 5, 10 und 15 Minuten war die Hemmung der Aufnahme hochsignifikant ($p<0.001$), nach 25 Minuten noch signifikant ($p<0.05$).

Wie bereits erwähnt sind Transportmechanismen für Aminosäuren zum Teil nicht sehr spezifisch und überlappen sich auch. Da für ein und dieselbe Aminosäure möglicherweise mehrere verschiedene Aufnahmesysteme an einem Gewebe für die Aufnahme verantwortlich sind mußte sichergestellt werden, daß die verminderte Aufnahme tatsächlich auf eine Enzymhemmung und nicht nur auf eine mögliche Verdrängung des Cysteins durch Serin am Transportmechanismus zurückzuführen ist.

Da bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten der Hemmeffekt am deutlichsten zu sehen war, wurden hier die Aufnahmen von Cystein, Cystein mit Serin-Borat und Cystein mit Serin verglichen. Es stellte sich heraus, daß auch Serin ohne Zusatz von Borat zu der selben Aufnahmehemmung führt wie die Kombination. Da Serin ohne Borat keinen Einfluss auf die Aktivität der y-Glutamyl-Transpeptidase besitzt und Serin nicht als Akzeptor für den y-Glutamylrest in Frage kommt, steht fest, daß die beobachtete Hemmung nicht im Zusammenhang mit dem y-Glutamyl-Zyklus steht, sondern daß es sich vielmehr um eine gegenseitige Verdrängung aus dem Transportsystem handeln muß.

6.3.2.2 Einfluß von Serin-Borat auf die Glutamin-Aufnahme

Glutamin zählt zu den Aminosäuren, die zumindest teilweise über den y-glutamyl-Cyclus aufgenommen werden (Tate u. Meister, 1974). Wie Abb.5.12 zeigt, wird Glutamin rasch in Abhängigkeit von der Zeit in die Inselzellen aufgenommen.

Wie bei den Versuchen mit Cystein wurde auch hier versucht, durch Hemmung der y-Glutamyl-Transpeptidase den Membrantransport von Glutamin zu bremsen. Wiederum konnte nach 10 Minuten die Glutaminaufnahme durch Serin-Borat signifikant gehemmt werden und wiederum konnte auch Serin alleine dieselbe Hemmwirkung erzeugen. Zusätzlich wurde noch die Wirkung von Borat untersucht. Hier ergab sich kein Unterschied zu den Versuchen ohne Zusatz.

Nach diesen Versuchen steht fest, daß die Pankreasinsel trotz ihrer y-Glutamyl-Transpeptidase-Aktivität nicht zu den Geweben zählt, an denen eine nennenswerte Aufnahme von Aminosäuren über den y-Glutamyl-Zyklus läuft. Daß möglicherweise kleinste Mengen ihren Weg über dieses Transportsystem nehmen kann nicht völlig ausgeschlossen werden, für den Stoffwechsel und die Funktion der Inselzellen dürften diese aber keine Bedeutung haben.

Mag dieser Transport auch an der Niere gezeigt worden sein, so gibt es durchaus Argumente, die es fraglich erscheinen lassen, ob das System auch an anderen Geweben existiert.

So ist die Aktivität der y-Glutamyl-Transpeptidase an der Insel verglichen mit anderen Geweben zwar relativ hoch, im Vergleich mit der Niere beträgt sie aber nur ca.13% der dort gemessenen Aktivität (Anjanejulu et al., 1981). Es ist daher durchaus denkbar, daß trotz des recht empfindlichen Systems ein vorhandener geringer Effekt nicht zu beweisen war.

Gegen die Annahme, daß es sich bei diesem System um einen in vielen Geweben vorkommenden leistungsfähigen Transportmechanismus handelt, spricht auch die Tatsache, daß für die Aufrechterhaltung dieses Kreislaufs relativ viel Energie aufgewendet werden muß. So werden für die Ausschleusung und Spaltung des Glutathions, die Aufnahme der Bruchstücke und die anschließende Neusynthese von GSH 3 ATP verbraucht. Dies ist deutlich mehr, als andere Transportmechanismen, die ihre Energie aus dem Natriumgradienten beziehen.

Es ist aber durchaus denkbar, daß es sich hier um ein sehr spezifisches Aufnahmesystem handelt, das normalerweise nur über eine geringe Kapazität verfügt und nur an der Niere auch quantitativ eine Rolle spielt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

7.1 Fragenstellung

1. Es sollte ein geeignetes System zur Aufnahmemessung von Aminosäuren und GSH an der Langerhansschen Insel der Ratte installiert und unter verschiedenen Bedingungen getestet werden.

2. Es sollte untersucht werden, wie Leucin in höheren Konzentrationen von der Insel aufgenommen wird und ob die Aufnahme möglicherweise bereits in einem Konzentrationsbereich, in dem noch keine Wirkung auf die Insulinsekretion gemessen werden kann, gesättigt ist.

3. Es war die Frage zu klären, ob Glutathion in die Zellen der Langerhansschen Insel aufgenommen wird. Weiter sollte auch das Aufnahmeverhalten von N-Acetyl-Cystein und Cystein untersucht werden, um Fragen zur Lokalisation der Thiolwirkung auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion beantworten zu können.

4. Zum Abschluß sollte untersucht werden, ob die Aufnahme von Aminosäuren in die Inselzellen in irgendeinem Zusammenhang mit dem Thiolstatus der Zelle stehen und ob sich Anhaltspunkte für ein Funktionieren des γ-Glutamyl-Zyklus an der Insel finden lassen.

7.2 Versuchsergebnisse

7.2.1 Aufnahme von Leucin

In allen untersuchten Konzentrationen wird Leucin rasch in die Insel aufgenommen.
In einem Konzentrationsbereich von 1 yM bis 1 mM folgt die aufgenommene Menge proportional der Konzentration im Medium. Eine Konzentrationserhöhung um den Faktor 10 führt zu einer fünffach gesteigerten Aufnahme.
Die Anhebung der Konzentration von 1 mM auf 10 mM führt schließlich nur noch zu einer 1.5 fach gesteigerten Aufnahme.

Trotzdem zeigt Leucin in einer Konzentration von 1 mM keinen Einfluß auf die Insulinsekretion, während in einer Konzentration von 10 mM die bekannte glucosunabhängige Stimulation zu sehen war.

7.2.2 Aufnahme von Glutathion und N-Acetyl-Cystein

GSH wird während einer Inkubationsdauer von 10 Minuten nicht von der Langerhansschen Insel aufgenommen. Zu keiner Inkubationszeit und bei keiner Konzentration zeigt sich ein Unterschied zwischen Sucrose als extrazellulärem Marker und Glutathion.

N-Acetyl-Cystein zeigt dasselbe Verhalten. Während einer Inkubationszeit von 25 Minuten war bei einer Konzentration von 0.1 mM keine messbare Aufnahme festzustellen.

7.2.3 Aufnahme von Cystein

Cystein wird rasch von den Zellen der Langerhansschen Insel aufgenommen. Bereits nach etwa 5 Minuten ist der halbmaximale Effekt zu sehen und zwischen 20 und 25 Minuten stellt sich eine Sättigung ein. Die Werte sind quantitativ mit den mit Leucin gemessenen Daten vergleichbar.

7.2.4 Beeinflussung der Glutaminaufnahme durch GSH und Diamid

Eine leichte Steigerung der Glutaminaufnahme durch GSH (0.1 mM) war nicht signifikant. Auch Arbeit in albuminfreiem Medium änderte nichts an diesem Ergebnis.
Die Oxidation des intrazellulären GSH durch Diamid (0.1 mM) hatte ebenfalls keinen Einfluß auf den Transport von Glutamin in die Inselzellen.

7.2.5 Beeinflussung des Aminosäurentransport durch Hemmung der γ-Glutamyl-Transpeptidase

Sowohl bei Cystein als auch bei Glutamin konnte durch Serin-Borat die Aufnahme in die Insel signifikant gehemmt werden. In beiden Fällen war diese Hemmung auch durch Serin ohne den für die Erzymhemmung notwendigen Boratzusatz zu erreichen.

7.3 Schlußfolgerungen

7.3.1 Leucin

Erst im Bereich zwischen 1 und 10 mM tritt eine Sättigung der Leucinaufnahme ein. Für die Insulinsekretion muß hier auch eine Schwellenkonzentration zu finden sein, da bei 1mM noch kein Effekt und bei 10 mM, einer Konzentration, die nur zu einer 1.5 fach höheren Aufnahme führt, bereits der maximale Effekt zu sehen ist.

7.3.2 Glutathion und N-Acetyl-Cystein

Da beide Stoffe während einer Inkubationszeit von 10 Minuten nicht in die Zellen der Langerhansschen Insel aufgenommen werden, die potenzierende Wirkung auf die Insulinsekretion nach dieser Zeit aber zu sehen ist, müssen beide über einen extrazellulär lokalisierten Mechanismus wirken.

7.3.3 Cystein

Da Cystein in die Insel aufgenommen wird ist es wahrscheinlich, daß es seine Wirkung auf die Insulinsekretion über einen intrazellulär lokalisierten Mechanismus wie z.B. die Beteiligung an der GSH-Synthese vermittelt. Eine extrazelluläre Wirkung kann zwar nicht ausgeschlossen werden, die Affinität des Systems zu Cystein wäre aber deutlich geringer verglichen mit GSH und N-Acetyl-Cystein.

7.3.4 Bedeutung des y-Glutamyl-Zyklus für die Aufnahme von Aminosäuren

Da eine Hemmung der y-Glutamyl-Transpeptidase keinen Einfluß auf den Aminosäurentransport in die Zellen der Langerhansschen Insel hat, ist anzunehmen, daß dieser Transportmechanismus an der Insel keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Daß weder die Zufuhr extrazellulären Glutathions noch die Oxidation des intrazellulären Glutathions die Glutaminaufnahme beeinflussen kann, bestärkt diese Annahme zusätzlich.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Ammon, H.P.T. , Akhtar, M.S. Niklas, H. , Hegner, D. (1977)
Inhibition of p-chlormercuribenzoate- and glucose- induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide and tert-butylhydroperoxide.
Mol.Pharmacol. 13, 598-605

Ammon, H.P.T. , Hoppe, E. , Akhtar, M.S. , Niklas, H. (1979a)
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents of islets on the insulin released interactions in vitro with methylene blue, thiol oxidants and p-chloromercuribenzoate.
Diabetes 28, 593-599

Ammon, H.P.T. , Akhtar, M.S. , Grimm, A. , Niklas, H. (1979b)
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH / GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg§ Arch.Pharmacol. 307, 91-96

Ammon, H.P.T. (1975)
Effect of tolbutamide on aminophylline-,3,5,-AMP-dibutyrate- or glucagon- induced insulin release from rat pancreatic islets after impairment of pyridine nucleotide metabolism caused by 6-aminonicotinamide (6-AN).
Naunyn-Schmiedeberg§ Arch.Pharmacol. 290, 251-264

Ammon, H.P.T. , Verspohl, E.J. (1976)
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Ammon, H.P.T. , Verspohl, E.J. (1979)
Effects of methylene blue on pyridine nucleotides and insulin secretion of rat pancreatic islets.
Diabetologia 17, 41-44

Ammon, H.P.T. , Grimm, A. , Lutz,S. , Wagner-Teschner,D. , Händel, M. , Hagenloh, I. (1980)
Islet glutathione and insulin release
Diabetes 29, 830-834

Ammon, H.P.T. , Hoppe, E. , Eujen, R. , Lutz, S. (1981)
Effects of leucine on GSH levels of rat pancreatic islets
Horm.Metab.Res. 13, 60-61

Ammon, H.P.T. , Abdel-Hamid, M. (1981)
Potentiation of the insulin releasing capacity of tolbutamide by thiols: Studies on the isolated perfused pancreas.
Naunyn-Schmiedeberg§ Arch.Pharmacol. 317, 262-26

Ammon, H.P.T. , Hägele, R. , Youssif, N , Eujen, R. , El-Amri, N. (1983)
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release.
Endocrinology 112, 720-726

Ammon, H.P.T. , Steinke, J (1972a)
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in the rat.
Diabetes 21, 143-148

Anderson, M.E. , Bridges, R.J. , Meister, A. (1980)
Direct evidence for interorgan transport of glutathione and that the non filtration renal mechanism for glutathione utilization involves y-glutamyl transpeptidase

Anjaneyulu, K. , Anjaneyulu, R. , Sener, A. , Malaisse, W.J. (1981)
y-glutamyl-transpeptidase activity in pancreatic islets
FEBS Lett. 125, 57-59

Ashcroft, S.J.H. , Weerasinghe, L.C.C. , Basset, J.M. , Randle, P.J. (1972c)
The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets.
Biochem.J. 126, 525-532

Ashcroft S.J.H. , Werasinghe, L.C.C. , Bassett, J.M. , Randle, P.J. (1972c)
The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets.
Biochem.J. 126, 525-532

Ashcroft S.J.H. , Weerasinghe, L.C.C. , Randle, P.J. (1973)
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem.J. 132, 223-231

Ashcroft, S.J.H. , Christie, M.R. (1979)
Effects of glucose on the cytosolic ratio of reduced / oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans
Biochem.J. 184, 697-700

Bannai, S. , Tsukeda, H. (1979)
The export of glutathione from human diploid cells in culture.
J.Biol.Chem. 254, 3444-3450

Bartlett, D.C. , Scheele, G.A. (1980)
Calmodulin and calmodulin-binding proteins in canine pancreas.
In: Calmodulin and cell function
Ann.N.Y.Acad.Sci. 356, 356-357

Bartoli, G.M. , Sies, H. (1978)
Reduced and oxidized glutathione efflux from liver
FEBS Lett. 86, 89-91

Beatty, P.W. , Reed, D.J. (1980)
Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes.
Arch.Biochem.Biophys. 204, 80-87

Beatty, P.W. , Reed, D.J. (1981)
Influence of cysteine upon the glutathione status of isolated rat hepatocytes.
Biochem.Pharmacol. 30, 1227-1230

Berggren, M. , Dawson, J. , Moldeus, P. (1984)
Glutathione biosynthesis in the isolated perfused rat lung: utilization of extracellular glutathione.
FEBS Lett. 176, 189-192

Bloom, G.D. , Hellman, B. , Idahl, L.-A. , Lernmark, A. , Sehlin, J. , Täljedal, I.-B. (1972)
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic B-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem.J. 129, 241-254

Bonamomi, L. , Gazzaniga, A. (1980)
Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine.
Eur.J.Respir. Dis. 61, Suppl. 111, 45-51

Brackertz, R.F. (1984)
Einfluss von N-acetyl-L-cystein auf die Insulinsekretion der Ratte.
Dissertation Tübingen

Brisson, G.R. , Malaisse-Lagae, F , Malaisse, W.J. (1972)
The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release: VII: A proposed site of action of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate.
J.Clin.Invest. 51, 232-241

Butler, J. , Spielberg, S. (1981)
Decrease of intracellular cystine content in cystinotic fibrinoblasts by inhibitors of y-glutamyl transpeptidase
J.Biol.Chem. 256, 4160-4163

Charles, M.A. , Lawecki, J. , Pictet, R. , Grodsky, G.M. (1975)
Insulin secretion. Inrerreletionship of glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and calcium.
J.Biol.Chem. 250, 6134-6140

Christensen, H.N. , de Cespedes, C. , Handlogten, M.E. , Ronquist, G. (1973)
Energization of amino acid transport, studied for the Ehrlich ascites tumor cell.
Biochem Biophys.Acta 300, 487-522

Cooperstein, S.J. , Lazarow, A. (1977)
Uptake of amino acids by islets of Langerhans and other tissues of the toadfish
Am.J.Physiol. 233(1): E 19 - E 27

Coore, H.G. , Randle, P.J. (1964)
Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.
Biochem.J. 93, 66-78

Cooper, A.J.L. (1983)
Biochemistry of sulfur containing amino acids
Ann.Rev.Biochem. 52, 187-222

Crawhall, J.C. , Segal, S. (1967)
The intracellular ratio of cysteine and cystine in various tissues.
Biochem.J. 105, 891-896

Curry, D.L. , Bennett, L.L. , Grodsky, G.M. (1968)
Requirement for calcium ion in insulin secretion by perfused rat pancreas
Am.J.Physiol. 214, 174-178

Dethmers, J.K. , Meister, a. (1981)
Glutathione export by human lymphoid cells; Depletion of glutathione by inhibition of its synthesis decrease.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol 78, No.12, 7492-7496

Dorn, A. , Koch, G. , Kohnert, K.-D. , Ansorge, S , Zühlke, H. , Arlt, B. , Lorenz, D. (1978)
The immunohistochemical demonstration of the thiol: proteiindisulfid oxidoreductase (TPO) in pancreas and isolated Langerhans´islet. A light- , fluorescent- and electron microscopic study.
Acta histochem. 62, 200-208

Eklow, L. , Thor, H. , Orrenius, S. (1981)
Formation and efflux of glutathione disulfide studied in isolated rat hepatocytes.
FEBS Lett. 127, 125-128

Estrela, J.M. , Saez, G.T. , Such, L. , Vina, J. (1983)
The effect of cysteine and N-acetylcysteine on rat liver glutathione.
Biochem.Pharmacol. 32 No 22

Fahey, R.C. (1977)
Biological important thiol-disulfide reactions and the role of Cyst(e)ine in proteins: an evolutionary perspective
Adv.Exp..Med.Biol. 86a, 1-30

Fajans, S.S. , Floyd, J.C. , Knopf, R.F. , Guntsche, E.M. , Rull, J.A. , Thiffault, C.A. , Conn, J.W. (1967)
A difference in mechanism by which leucine and other amino acids induce insulin release.
J.Clin.Endocr. 27, 1600

Fajans, S.S. , Floyd, J.C. , Pek, S. , Wissman, P. , Conn, J.W. (1972)
Amino-acids and insulin release in vivo
Isr.J.Med.Sci. 8, 233-243

Finkelstein, J.P. , Kyle, W.E. , Harris, B.J. , Martin, J.J. (1982)
Methionine metabolism in mammals: Concentration of metabolites in rat tissues.
J.Nutr. 112, 1011-1018

Gazzaniga, A. , Borgogelli, E. , Giulidori, P. , Maneoni, G. , Martinetti, M. , Milan, C. (1976)
Pharmacocinetics and metabolism of 35-S labelled N-acetylecysteine.
Unpublished report

Greenberg, D.M. (1975)
Biosynthesis of cysteine and cystine.
In: Metabolic pathways, Vol VII: Metabolism of sulfur compounds. Green, D.M. (ed.), Academic press, New York, pp. 505-528

Griffith, O.W. , Novogrodsky, A. , Meister, A. (1979)
Translocation of glutathione from lymphoid cells that have markedly different y-glutamyl transpeptidase activities.
Procl.Natl.Acad. Sci. USA 76, 2245-2252

Grodsky, G.M. , Batts, A. , Bennett, L.L. , Vcella, C. , McWilliams, N.B. , Smith, D.F. (1963)
Effect of carbohydrate on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Amer.J.Physiol. 205, 638-644

Hahn, R. , Wendel, a. , Flohe, L. (1978)
The fate of extracellular glutathione in the rat
Biochim.Biophys.Acta 539, 324-337

Hahn, H.-J. , Gylfe, E. , Hellman, B. (1980)
Calcium and pancreatic beta-cell function: 7. Evidence for cyclic AMP-induced translocation of intracellular calcium.
Biochim.Biophys.Acta 630, 425-432

Heinle, H. , Sawatzki, G. , Wendel, A. (1976)
Glutathionbiosynthese VII. Die Biosynthese von Glutathion in Humanerythrocyten.
Hoppe-Seylerŝ Zeit., Physiol.Chem. 357, 1451

Hehl, K.H. (1984)
Untersuchungen zur Beeinflussung der Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte durch exogene Thiole
Dissertation Tübingen

Hellerström, C. (1964)
Method for microdissection of intact pancreatic islets of mammals.
Acta endocrinol.. (Kbh) 45, 122-132

Hellman, B. , Sehlin, J. , Täljedal, I.-B. (1971a)
Transport of aminisobutyric acid in mammalian pancreatic B-cells.
Diabetologia 7, 256-265

Hellman, B. , Sehlin, J. , Täljedal, J.-B. (1971b)
Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic ß-cells.
Biochim.Biophys.Acta 241, 147-154

Hellman, B. , Sehlin, J. , Täljedal, J.-B. (1971c)
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues
Biochem.Biophys.Res.Comm. Vol 45 No.6 210-216

Hellman, B. , Sehlin, J. , Täljedal, J.-B. (1972)
Transport of L-leucine and D-leucine into pancreatic ß-cells with reference to the mechanism of amino acid - induced insulin release.
Biochim.Biophys.Acta 266, 436-443

Hellman, B. , Idahl, L.A. , Lernmark, A. , Sehlin, J. , Täljedal, I.-B. (1973a)
Iodacetamide-induced sensitization of pancreatic B-cells to glucose stimulation.
Biochem.J. 132, 775-789

Hellman, B. , Idahl, L.A. , Lernmark, A. , Sehlin, J. , Täljedal, I.-B. (1974a)
The pancreatic beta-cell recognition of insulin secretagogues. VIII. Comparisonf of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.
Arch.Biochem.Biophys. 162, 448-457

Hellman, B. , Idahl, L.-A , Lernmark, A. , Sehlin, J. , Täljedal, I.-B. (1975b)
Stimulation of insulin release by thiols
Biochim.Biophys.Acta 392, 101-109

Hellman, B. (1976)
Effects of starvation and Ca2+ on glucose-induced accumulation of cyclic 3',5'-AMP in pancreatic islets.
Experientia 32, 155-157

Hellman, B. , Sehlin, J. , Täljedal, J.-B. (1976)
Effects of glucose on 45-Ca-2+ uptake by pancreatic islets studied with the lanthanum method.
J.Physiol. (1976) 639-656

Henquin, J.C. , Lambert, A.E. (1974)
Study of the mechanism of Cobalt Co(2+)-induced inhibition of immunoreactiv insulin (IRI) release
Diabetologia 10, 368-369

Henquin, J.C. , Lambert, A.E. (1976)
Carbonate modulation of glucose induced biphasic insulin release by rat islets.
J.Physiol. (1976) 713-721

Henquin, J.C. (1977)
Tetraaethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 77, 551-556

Henquin J.C. (1978a)
D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells.
Nature 271, 271-273

Henquin, J.C. , Meissner, H.P. (1978)
Valinomycin inhibition of insulin release and alteration of electrical properties of pancreatic beta-cells.
Biochim.Biophys.Acta 543, 455-464

Henquin, J.C. (1981)
Effects of trifluoperazine and pimozide on stimulus-secretion coupling in pancreatic ß-cells.
Biochem.J. 196, 771-780

Howell, S.L. , Tyhurst, M. (1982)
Microtubules, microfilaments and insulin secretion.
Diabetologia 22, 301-308

Mc Intyre, T. , Curthoys, N.P. (1982)
Renal catabolism of glutathione
J.Biol.Chem. 257, 11915-11921

Kondo, T. , Dale, G. , Beutler, E. (1980)
Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 6359-6362

Kosower, E.M. , Correa, W. , Kinon, B.J. , Kosower, N.S. (1972)
Glutathione VII. Differentiation among substrates by the thiol oxidizing agent diamide.
Biochim.Biophys.Acta 264, 39-44

Kosower, E.M. , Kosower, N.S. , Kanety-Londner, H. , Levy, L. (1974)
Glutathione IX. New thiol oxidizing agents: DIP, DIP + , DIP++.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 59, 347-351

Kosower, E.M. , Kanety-Londner, H. (1976)
Glutathione XIII. Mechanism of thiol oxidation by diazene-dicarboxylic acid derivatives.
Am.Chem.Soc. 98, 3001-3007

Kosower, N.S. , Kosower, E.M. (1978)
The glutathione status of cells.
Int.Rev.Cytol. 54, 109-160

Kosower, N.S. , Kosower, E.M. (1976)
Functional aspects of glutathione disulfide and hidden forms of glutathione.
In: Glutathione: Metabolism and function (eds.: Arias, I.M. , Jacoby, W.B.) Ravens Press, New York, 159-172

Krausz, Y. , Wollheim, C.B. , Siegel, E. , Sharp, G.W.G. (1980)
Possible role for calmodulin in insulin release: studies with trifluoperazin in rat pancreatic islets.
J.Clin.Invest. 66, 603-607

Lacy, P.E. (1961)
Electron microscopy of the ß-cell of the pancreas
Am.J.Med. 31, 851-859

Lacy, P.E. , Kostianovsky, M. (1967)
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas
Diabetes 16, 35-39

Lacy, P.E. , Howell, S.L. , Young, D.A. , Fink, C.J. (1968)
New hypothesis of insulin secretion.
Nature 219, 1177-1179

Landgraf-Leurs, M.M.C. , Mayer, L. , Landgraf, R. (1978)
Sulfhydryl requirement for insulin release from the perfused pancreas. Studies with ethacrynic acid and dithioeritol.
Diabetologia 15, 337-342

Lash, L.H. , Jones, D.P. (1983)
Transport of glutathione by renal basal-lateral membrane vesicles.
Biochem.Biophys.Res.Comm.112, 55-60

Le Cam, A. , Freychet, P. (1977)
The use of dispersed pancreatic islets in measurement of transmembrane transport.
Analyt.Biochem. 63, 73-79

Lernmark, A. (1971)
Isolated mouse islets as a model for studying insulin release.
Acta Diabet.Lat. 8, 649

Lernmark, A. (1975)
The use od dispersed pancreatic islet cells in measurement of tramsmembrane transport
Anal.Biochem. 63, 73-79

Lorber, A. , Chang, C.C. , Masuoka, D. , Meecham, I. (1970)
Effect of thiols in biological systems on protein sulfhydryl content.
Biochem.Pharmacol. 19, 1551-1560

Malaisse, W.J. , Malaisse-Lagae, F. , Mayhew, D. (1967)
A possible role for the adenylatcyclase system in insulin secretion.
J.Clin.Invest. 46, 1724-1734

Malaisse, W.J. (1973a)
Insulin secretion: multifactorial regulation for a process of release.
Diabetologia 9, 167-173

Malaisse, W.J. , Devis, G. , Pipeleers, D.G. , Somers, G. , Van Obberghen, E (1974)
Glucose metabolism and insulin release: the role of glyceraldehyde.
Diabetologia 10, 379

Malaisse, W.J. , Hutton, J.C. , Carpinellei, A.R. , Herchulez, A. , Senner, A. (1980)
The stimulus-secretion coupling of amino acid induced insulin release. Metabolism and cationic effects of leucine.
Diabetes 29, 431-437

Malaisse, W.J. , Senner, A. , Malaisse-Lagae, F. , Welsch, M. , Mathews, D. , Bier, D.M. , Hellström, C. (1982)
The stimulus secretion coupling of amino acid induced insulin release. Metabolic response of pancreatic islets to L-glutamine and L-leucine.
J.Biol.Chem. 257, 8731-8735

Mark, M. (1983)
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Meister, A. (1975)
Biochemistry of glutathione
In: Metabolism of sulfur compounds, 3. Edition, ed.by D.M. Greenberg, pp. 101-188, Academic Press, New York

Meister, A. , Griffith, R. (1980)
New aspects of glutathione metabolism and translocation in mammals.
Exerpta medica Sulphur in biology (Ciba foundation symposium 72)

Meister, A. (1983a)
Metabolism and transport of glutathione and other y-glutamyl compounds.
In: Functions of glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed.by A.Larsson et al., Ravens Press, New York, pp. 1-22

Meister, A. , Anderson, M.E. (1983b)
Glutathione
Ann.Rev.Biochem. 52 , 711-760

Milner, R.D.G. (1969)
The mechanism by ehich leucine and arginine stimulate insulin release in vitro.
Biochim.Biophys.Acta 192, 154-156

Morin, J.E. , Kent, A. , Dixon, J.E. (1983)
Purification of thiol protein disulfide oxidoreductases and possible biological functions.
In: Functions of glutathione. Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed.by A.Larsson et al., Ravens Press, New York, pp. 285-295

Orlowski, M. , Wilk, S. (1976)
Metabolism of y-glutamyl-amino acids and peptides in mouse liver and kidney in vivo.
Eur.J.Biochem.71, 549-555

Ormstad, K. , Lastbom, T. , Orrenius, S. (1980)
Translocation of amino acids and glutathione studied with the perfused kidney and isolated renal cells.
FEBS Lett. 112, 55-59

Owen, W. , Griffith, R. , Meister, A. (1978)
Evidence that the y-glutamyl-cycle functions in vivo using intracellular glutathione. Effects of amino acids and selective inhibitions of enzymes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 5405-5408

Owen, W. , Griffith, R. , Bridges, J. , Meister, A. (1979)
Transport of y-glutamyl amino acids; Role of glutathione and y-glutamyl-transpeptidase.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 6319-6322

Panten, U. , Christians, J. , v. Kriegstein, E. , Poser, W. , Hasselblatt, A. (1973)
Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 9, 477-482

Pagliara, A.S. , Hover, B.A. , Ellerman, J. , Matschinsky, F.M. (1975)
Iodacetate and iodacetamide-induced alterations of pancreatic and ß-cell responses
Endocrinology 97, 698

Pfäffle, M. (1984)
Diplomarbeit
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Tübingen

Puri, R.N. , Meister, A. (1983)
Transport of glutathione as y-glutamylcysteinylglycyl ester into liver and kidney.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 5258-5260

Randle, P.J., Ashcroft, S.J.H., Gill, J.R. (1968)
Carbohydrate metabolism and release of hormones
in Carbohydrate metabolism and its disorders,
ed. by F. Diekens, P.J. Randle and W.J. Whelan
London: Academie, vol.1, 427-447

Rankin, B.B. , Curthoys, N.P.
Evidence for the renal paratubular transport of glutathione.
FEBS Lett. 147

Reed, D.J. , Beatty, P.W. (1981)
The role of cystathione pathway in glutathione regulation by isolated hepatocytes

Reed, D.J. , Orrenius, S. (1977)
The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated hepatocytes.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 77, 1257-1264

Reed, D.J. , Brodie, A.E. , Meredith, M.J. (1983)
Cellular heterogeneity in the status and functions of cysteine and glutathione.
In: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects, ed.by a.Larsson et al., Ravens Press, New York, pp. 39-49

Revel, J.P. , Bahl, E.G. 1959
J.Biol.Chem. 234, 577-582

Reynolds, R. , Rea, C. , McNamara, S. (1979)
The effect of diamide on amino acid transport by rat renal cortex slices.
Biochim.Biophys.Acta 557, 449-459

Richardson R.J., Wilder, A.C. , Murphy, S.D. (1977)
Maintenance of glutathione levels in renal cortex slices of the rat.
Proc.Sci.Exp.Biol.Med. 154, 360-364

Richman, P.G. , Meister, A. (1975)
Regulation of y-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione.
J.Biol.Chem. 250, 1422-1426

Schubart, U.K. , Erlichmann, J. , Fleischer, N. (1980)
The role of calmodulin in the regulation of protein phosphorylation in insulin release in hamster insulinoma cells.
J.Biol.Chem. 225, 4120-4124

Sharp, G.W.G. , Wollheim, C. , Müller, W.A. , Gutzeit, A. , Truehart, P.A. , Blondel, B. , Orci, l: , Renold, A.E. (1975)
Studies on the mechanism of insulin release.
Fed.Proc. 34, 1537-1548

Sheffner, A. (1963)
The reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine.
Ann.New York Acad. Sci. 106, 298-310

Sheffner, A. , Medler, E.M. , Bailey, K.R. , Gallo, D.G. , Mueller, A.J. , Sarett, H.P. (1966)
Metabolic studies with acetylcysteine.
Biochem.Pharmacol 15, 1523-1535

Sies, H. , Gerstenecker, C. , Menzel, H. , Flohe, L. (1972)
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobinfree perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.
FEBS Lett. 27, 171-175

Srivastava, S.K. , Beutler, E. (1969)
The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes.
J.Biol.Chem.244, 9-16

Sugden, M.C. , Christie, M.R. , Ashcroft, S.H.J. (1979)
Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans.
FEBS Lett. 105, 95-100

Sugden, M.C. , Ashcroft, S.J.H. (1978)
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermeditates and methylxanthines on calcium uptake by a mitochondrial fraction from the rat pancreatic islet.
Diabetologia 15, 173-180

Tate, S. , Meister, A.
Serine-borate complex as a transition state inhibitor of y-glutamyl-transpeptidase
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 4806-4809

Tate, S. , Meister, A. 1974
Interaction of y-glutamyl-transpeptidase with amino acids, dipeptides and derivatives and analogs of glutathione
J.Biol.Chem. 249, 7593-7602

Tateishi, N. , Nigashi, T. , Naruse, A. , Nakashima, K. , Shiozaki, H. , Sakomoto, Y. (1977)
Rat liver glutathione: Possible role as a reservoir of cysteine.
J.Nutr. 107, 51

Thor, H. , Moldeus, P. , Orrenius, S. (1979)
Effects of cysteine, N-acetylcysteine and methionine on glutathione biosynthesis and brombenzene toxicity in isolated rat hepatocytes.
Archs.Biochem.Biophys. 192, 405-4013

Tsao, B. , Curthoys, N.P. 1980
The absolute asymmetry of orientation of y-glutamyltranspeptidase and aminopeptidase on the external surface of the rat renal brush border membrane
J.Biol.Chem. 255, 7708-7711

Verspohl, E.J. , Händel, M. , Amron, H.P.T. (1979)
Pentosephosphate shunt activity of rat pancreatic islets : Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269-1274

Vina, J. , Puertes, I. , Estrela, J.M. , Vina, J.R. , Galbis, J.L. (1981)
Involvement og y-glutamyltransferase in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat.
Biochem.J. 194, 95-102

Wahl, M. (1983)
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Weiss, B. , Prozialeck, W. , Cimino, M. , Sellinger Barnette, M. , Wallace, T.L. (1980)
In: Calmodulin and cell function
Ann.N.Y.Acad.SCi. 356, 319-345

Williamson, J.M. , Meister, A. (1981)
Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a 5-oxo-L-prolinase substrate.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 936-939

Whikehart, D.R. , Edelhauser, H.E. (1978)
Glutathione in rabbit corneal endothelia
Invest.Ophtal.Visual.Sci. 17, 455-464

Zawalich, W.S. , Karl, R.C. , Ferrendelli, J.A. , Matschinsky, F.M. (1975)
Factors governing glucose induced elevation of cyclic 3',5-AMP levels in pancreatic islets.
Diabetologia 11, 231-235

Zawalich, W.S. , Pagliara, A.S. , Matschinsky, F.M. (1977)
Effects of jodacetate, mannoheptulose and 3-O-methyl-glucose on the secretory function and metabolism of isolated pancreatic islets.
Endocrinology 100, 1276-1283

L E B E N S L A U F

Andreas Martin Fuss

geboren am 6.Juli 1957

Eltern: Helmut Fuss, Kaufmann und
Renate Fuss, geb.Lubberger

Schulischer Werdegang:

1964-1967	Besuch der Grundschule an der christlichen Gemeinschaftschule Ebingen
1967-1976	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums Ebingen. Erwerb der Hochschulreife am 2.6.1976
Wehrdienst:	Grundwehrdienst vom 1.Juli 1976 bis zum 30. September 1977

Beruflicher Werdegang:

1977-1978	Besuch der Berufsfachschule für pharmazeutisch technische Assistenten
1978-1981	Beginn des Pharmaziestudium an der Universität Tübingen im April 1978
	Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung am 27. März 1980
	Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung am 16.Oktober 1981

1981-1982	Pharmaziepraktikum in der Schmiecha-Apotheke in Albstadt-Truchtelfingen und bei der Firma Dr. Karl Thomae GmbH in Biberach
	Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung am 28. Oktober 1982
	Erteilung der Approbation als Apotheker am 22. November 1982
1982-1986	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im November 1982 bei Herrn Prof.Dr. H.P.T.Ammon am Lehrstuhl Pharmakologie am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen
	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie von März 1983 bis Dezember 1984, am Lehrstuhl für Pharmakologie von Januar 1985 bis Februar 1985
	Seit März 1985 teilzeitbeschäftigt an der Zentralapotheke der Kreiskrankenhäuser des Zollern-Alb-Kreises in Balingen
	Abschluß der experimentellen Arbeiten zur Dissertation im Mai 1986
	Seit 25. Mai 1985 verheiratet mit Jutta Fuss, geb. Binder

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof.Dr.H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren

E.J. Verspohl (Pharmakologie)

E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie)

H. Auterhoff, K.-A. Kovar, J.E. Schultz (Pharmazeutische Chemie)

E. Graf, H. Hamacher (Pharmazeutische Technologie)

E. Lindner, E. Bayer (anorganische und organische Chemie)

K. Botzenhardt (medizinische Mikrobiologie)

H. Seiler (Physik)